

(19)  **Europäisches Patentamt**
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 170 364 A1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
09.01.2002 Patentblatt 2002/02

(51) Int Cl.7: **C12N 15/12, C12N 15/52,**
C12N 15/62, C12N 15/63,
C12N 15/85, C12N 9/00,
C12N 5/10, C07K 14/72

(21) Anmeldenummer: **00114622.4**

(22) Anmeldetag: **07.07.2000**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
 Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

• **Wunderlich, Thomas**
50668 Köln (DE)
 • **Rajewsky, Klaus**
50931 Köln (DE)

(71) Anmelder: **ARTEMIS Pharmaceuticals GmbH**
51063 Köln (DE)

(74) Vertreter: **Helbing, Jörg, Dr. Dipl.-Chem. et al**
Patentanwälte von Kreisler-Selting-Werner,
Bahnhofsvorplatz 1 (Deichmannhaus)
50667 Köln (DE)

(72) Erfinder:
 • **Edenhofer, Frank Oliver Stefan**
50374 Köln (DE)

(54) **Mutationen kryptischer Spleissstellen in Cre und Cre-Fusionsproteinen zur Verbesserung der Expression und Induzierbarkeit**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz, die für eine Mutante der Bakteriophagen P1-Rekombinase kodiert, in der eine spezielle kryptische Spleißstelle durch eine die Cre-Proteinsequenz ändernde Basenmutation ausgeschaltet ist, sowie eine DNA-Sequenz, die für ein Fusionsprotein aus der ge-

nannten Cre-Mutanten und einer ligandenbindenden Domäne eines Rezeptorproteins kodiert. Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren, Mikroorganismen und transgene Lebewesen, die solch eine DNA-Sequenz enthalten, sowie Cre-Mutanten oder Cre-Fusionsproteine, die von diesen DNA-Sequenzen kodiert werden.

EP 1 170 364 A1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz, die für eine Mutante der Bakteriophagen P1-Rekombinase kodiert, in der eine spezielle kryptische Spleißstelle durch eine die Cre-Proteinsequenz ändernde Basenmutation ausgeschaltet ist, sowie eine DNA-Sequenz, die für ein Fusionsprotein aus der genannten Cre-Mutanten und einer ligandenbindenden Domäne eines Rezeptorproteins kodiert. Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren, Mikroorganismen und transgene Lebewesen, die solch eine DNA-Sequenz enthalten, sowie Cre-Mutanten oder Cre-Fusionsproteine, die von diesen DNA-Sequenzen kodiert werden.

[0002] Unter Verwendung ortsspezifischer Rekombinasen können gezielte Veränderungen im Genom von Säugtieren vorgenommen werden. Die Bakteriophagen-P1-Rekombinase Cre erkennt spezifische Basensequenzen (loxP-Stellen) und kann -je nach Lage und Kombination dieser loxP-Stellen im Genom-Gene deletieren, invertieren, translozieren oder auf eine andere gewünschte Weise mutieren (zur Übersicht siehe Rajewsky et al., J. Clin. Invest. 98, 51 - 53 (1996)). Um das Mutationsereignis zu einem beliebigen Zeitpunkt in einem gezielten Gewebe oder Zelltyp der Maus zu induzieren, wurden u.a. posttranslationale Schalter für Cre-Aktivität entwickelt (Schwenk et al., Nucleic Acids Research 26, 1427-1432 (1998)). Dabei handelt es sich um Fusionsproteine aus Cre und der Liganden-bindenden Domäne von Steroid-Rezeptoren (nachfolgend "LBD", z. B. der Progesteron-Rezeptor, Östrogen-Rezeptor oder Glucocorticoid-Rezeptor). Derartige Cre-LBD-Fusionsproteine sind hinsichtlich ihrer Cre-Rekombinase-Funktionalität inaktiv, können aber durch Zugabe der entsprechenden Liganden (posttranslational) aktiviert werden. In Zellkultur bzw. transgenen Tieren wurden Mutanten von LBD getestet, die synthetische gegenüber natürlichen Liganden bevorzugen, damit die Cre-Aktivierung nicht durch endogene Hormone ausgelöst werden kann.

[0003] Die Anwendung dieser Technik in transgenen Mäusen unter Verwendung sowohl ubiquitär-aktiver, als auch zelltyp-spezifischer Promotoren ist publiziert worden (z.B. Schwenk et al. (1998); Kellendonk et al., J. Mol. Biol. 285, 175-182 (1999)). Zwar wird in diesen Arbeiten gezeigt, daß die posttranslationale Aktivierung von Cre über LBD prinzipiell funktioniert, das System hat jedoch zwei entscheidende Nachteile:

- 1) verminderte Aktivität von Cre-LBD in Vergleich zum unfusionierten Cre;
- 2) Hintergrund-Aktivität von Cre-LBD, d.h. Cre-Rekombinase-Aktivität auch in Abwesenheit von dem Liganden.

[0004] Die Hintergrund-Aktivität hat sich bei der Anwendung in vivo als problematisch erwiesen, insbesondere wenn dieses Ereignis sehr früh im Verlauf der Entwicklung eintritt. Dabei entstehen Mosaik-Tiere, in denen in einem Teil der Zellen das Rekombinationsereignis bereits stattgefunden hat, während im anderen Teil der Zellen die posttranslationale Kontrolle noch möglich ist. Wünschenswert wäre die Verfügbarkeit eines besser kontrollierten Cre-Regulationssystems, welches keine (meßbare) Hintergrund-Aktivität aufweist. An diesem Punkt setzt die hier vorgestellte Erfindung an.

[0005] Als mögliche Ursachen für die Hintergrundaktivität kommen in Frage:

- 1) kryptisches Spleißen der Cre-LBD-kodierenden mRNA in der Weise, daß ein trunkiertes Rest-Protein mit unregulierter Cre-Aktivität translatiert werden kann und
- 2) posttranslationale Degradation durch z.B. endogene Proteasen, die ein unreguliertes Cre prozessieren.

[0006] Überraschenderweise wurde gefunden, daß - wenn bestimmte Modifikationen in Cre-kodierenden Sequenzen wie z. B. Cre-LBD-kodierende Sequenzen eingeführt werden - diese unerwünschten Prozesse eliminiert werden:

- 1) Optimierung der Cre-kodierenden Sequenz hinsichtlich der Ausschaltung kritischer Spleißereignisse
- 2) Mutation bzw. Verkürzung des Linkerbereichs zwischen Cre und LBD, um die Zugänglichkeit für Proteasen in diesem Bereich zu erschweren.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft somit:

- (1) eine DNA-Sequenz, die für eine Mutante der Bakteriophagen-P1-Rekombinase Cre kodiert, in der die kryptische Spleißstelle in der Sequenz ATG GTG CGC, die der Position 1003 - 1011 in der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Wildtypsequenz entspricht, durch eine die Cre-Proteinsequenz ändernde Basenmutation ausgeschaltet ist;
- (2) eine DNA-Sequenz, die für ein Fusionsprotein aus der Bakteriophagen-P1-Rekombinase Cre und einem weiteren funktionellen Protein kodiert, wobei die die Bakteriophagen-P1-Rekombinase Cre kodierende Sequenz wie in (1) definiert ist;
- (3) eine bevorzugte Ausführungsform der unter (2) definierten DNA-Sequenz, wobei das weitere funktionelle Protein eine ligandenbindende Domäne eines Rezeptorproteins ist;
- (4) ein Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß (1), (2) und/oder (3);

(5) ein Mikroorganismus oder ein transgenes Lebewesen, enthaltend einen Vektor, wie in (4) definiert, und/oder eine DNA-Sequenz, wie in (1), (2) und/oder (3) definiert;
 (6) ein Cre-Mutante oder Cre-Fusionsprotein, das von der DNA-Sequenz gemäß (1), (2) und/oder (3) kodiert wird;
 (7) Verfahren zur Herstellung einer Cre-Mutante oder eines Cre-Fusionsproteins, wie in (6) definiert, umfassend das Kultivieren eines Mikroorganismusses oder einer Zellstruktur, der/die mit einem Vektor gemäß (4) transformiert oder transfiziert ist; und
 (8) Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß (2) oder (3) zur Mutagenese und/oder Rekombination von loxP-Stellen enthaltende Zielsequenzen in Lebewesen.

Figurenbeschreibung

[0008]

Fig. 1: Spleißmuster ausgewählter Cre-LBD-Konstrukte

A - D) Dargestellt sind die prä-mRNAs ausgewählter Cre-LBD Konstrukte mit kryptischen Spleiß- Donoren (SD) und Akzeptoren (SA). Die in Klammern angegebenen Werte drücken relative Wahrscheinlichkeiten der Nutzung dieser Stellen aus ('Score'). Der Score gibt an, wie ähnlich die Spleißstellen den Konsensus-Sequenzen (E) sind. Eine 100 %-ige Übereinstimmung zur SA ergibt einen Score von 14,2 und der Mittelwert für konstitutive Exons ist 7,9. Eine 100 %-ige Übereinstimmung mit der SD ergibt einen Score von 12,6 und der Mittelwert für konstitutive Exons ist 8,1. Eingezeichnet sind nur SD und SA, deren Score über 4 liegt. Die Scores werden berechnet mit Hilfe des Computerprogramms "splice site score calculation" (<http://www2.imcb.osaka-u.ac.jp/splice/score.html>). Verwendete Abkürzungen: SS, synthetisches Spleißsubstrat (Choi et al., Mol. Cell. Biol., 11, 3070 - 3074 (1991)); Cre19, Cre beginnend mit AS 19; hCre2, humanisiertes Cre beginnend mit AS 2; PR bzw. ER, LBD des Progesteron- bzw. Östrogenrezeptors, Zahlen geben AS-Position an; ERT2, LBD des Östrogenrezeptors mit den AS-Substitutionen G400V, M543A, L544A (Feil et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 237, 752 - 757 (1997)). bpA, Polyadenylierungssignal des Wachstumshormons vom Rind; Y, entweder C oder T.

Fig. 2: Ein über RT-PCR nachgewiesenes kryptisches Spleißereignis eines P1-CrePR650-914-kodierenden Konstrukts

Dargestellt ist der Fusionsbereich von Cre19PR650-914.

A) Sequenzvergleich der kryptisch gespleißten Sequenz (oben) mit der entsprechenden ungespleißten Sequenz (unten).

B) Schematische Darstellung des kryptischen Spleiß-Ereignisses. Wichtige AS in diesem Bereich sind eingezeichnet. Die Pfeile zeigen den Verlauf der PCR an: nach der RT-Reaktion wurde die Sequenz mit dem 5'-Primer und dem äußerem 3'-Primer amplifiziert. Nach der Isolation aus dem Agarosegel wurde eine semi-nested PCR mit dem 5'-Primer und dem weiter innen liegenden 3'-Primer vollzogen.

Fig. 3: Sequenzvergleich der 3'-Enden der verschiedenen Cre-kodierenden Sequenzen mit dem Konsensus für Spleiß-Donoren

Ausschnitt aus dem 3'-Ende der Cre-kodierenden Sequenz von

- A) P1-Cre
- B) hCre
- C) P1-CreV336A und
- D) hCreV336A.

Gezeigt ist der Bereich der Cre-Sequenz, wo die AS-Substitution eingeführt wurde. Die Basensequenz um V336 im P1-Cre zeigt eine hohe Homologie zum dargestellten Konsensus einer Spleiß-Donor-Stelle. Die Übereinstimmung nimmt im hCre noch zu, damit besteht ein höheres Risiko von kryptischem Spleißen an dieser Stelle. In den mutierten Sequenzen von P1-Cre und hCre wurde das Kodon 336 (Numerierung bezogen auf die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Wildtypsequenz) von GTG (Val) nach GCG (Ala) ausgetauscht; durch diesen Austausch ist kein Spleißen mehr möglich, da die Sequenz GTN als essentiell angesehen werden kann. Der Basenaustausch von T nach C ist an Position 1007, bezogen auf die Basensequenz des Wildtyp-Cre (SEQ. ID. NO:1, nach Sternberg et al., 1986)

Fig. 4: Aktivitätstest von Cre19PR676-914, hCre19PR676-914 und hCre19V336APR676-914 gemäß Beispiel 6 Die Balken geben Mittelwerte aus jeweils drei verschiedenen Transfektionen mit Standardabweichung wieder.

Weißer Balken stehen für prozentuale Aktivitäten der unmutierten Cre19PR676-914 bzw. hCre19PR676-914, schwarze Balken stehen für mutiertes hCre19V336APR676-914. Die Zahlen in den Balken geben die Induzierbarkeit des betreffenden Konstrukts an, die durch Division der prozentualen Aktivität im induzierten Zustand durch den Hintergrund errechnet wird. "+": 100 nM RU486 in Medium, "-": kein Induktor im Medium.

Fig. 5: Aktivitätstest von mutiertem P1-Cre im Vergleich zu mutiertem hCre in Fusion mit PR

Das Experiment wurde wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind zwei unabhängige Transfektionsrunden, deren Balken für Mittelwerte aus drei verschiedenen Transfektionen mit Standardabweichung stehen. Weißer Balken stehen für prozentuale Aktivitäten der Cre19-LBD-Konstrukte relativ zu CMV-Cre, graue Balken stehen für Cre19V336APR676-914, schwarze Balken stehen für hCre19V336A-LBD-Konstrukte. "+": 100 nM RU486 in Medium; "-": kein Induktor in Medium.

Fig. 6: Schematischer Vergleich der kryptischen Spleißmuster der verwendeten Cre-Sequenzen und Auswirkungen auf die Cre-Aktivität in Abwesenheit des Induktors

Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf den Vergleich der gezeigten Cre-Konstrukte in Fusion mit PR676-914 relativ zu unfusioniertem Cre (=100 %).

[0009] Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend näher beschrieben.

[0010] Um das Ausmaß kryptischer Spleißvorgänge in Cre-Fusionsproteinen abschätzen zu können, wurden über Computeranalysen Muster potentieller Spleißstellen erstellt (Fig. 1). Innerhalb der Cre-kodierenden Sequenz vom Bakteriophagen P1 (fortan kurz P1) tritt ein relativ starker Akzeptor am 5'-terminal auf, sowie fünf Donoren mittlerer Stärke in der 3'-Hälfte (Fig. 1 A). In der LBD-kodierenden Sequenz des Progesteron-Rezeptors (Nukleotide 1948 bis 2742 von SEQ ID NO:3, die für AS650 bis 914 des Wildtyp-Rezeptors kodieren, nachfolgend "PR") treten zwei Akzeptoren mittlerer, sowie ein SA mit extrem hoher Stärke auf (Fig. 1A-B). In der entsprechenden Östrogen-Rezeptor-Sequenz (nachfolgend "ER") liefert die Analyse nur zwei SA mit mittlerer Stärke (Fig. 1D). Eine oder mehrere der am 3'-Ende von P1-Cre liegenden Donor-Sequenzen könnten mit einem der Akzeptoren in PR bzw. ER ein Intron bilden. Durch Spleißen dieses Introns würde ein vorzeitiger Abbruch der Translation infolge der Verschiebung des Leserasters generiert, resultierend in ein verkürztes, möglicherweise konstitutiv aktives Cre-Protein ohne den regulatorischen Anteil der LBD. Es konnte über RT-PCR nachgewiesen werden, daß ein derartiges kryptisches Spleißen in eukaryontischen Zellen tatsächlich auftritt (siehe Fig. 2). Die Funktionalität der SA (11,2) im PR in physiologischem Kontext wurde von Balleine et al., J. Clin. End. Meta. 84, 1370-1377 (1999) publiziert. In dieser Publikation wird ein alternativ gespleißtes Transkript des humanen Progesteronrezeptors beschrieben, das in gehäuftem Maße in Brustkrebstumoren auftritt. Normalerweise ist es von geringer Bedeutung, wenn ein sehr geringer Anteil transgener Transkripte kryptisch gespleißt wird. Doch im Falle von Cre-LBD-Transkripten kann auch nur ein verschwindender Teil kryptischer Spleißprodukte das Auftreten der beobachteten Cre-Hintergrundaktivität erklären.

[0011] Durch Angleichung des Kodon-usage wird die Cre-Sequenz (F.Stewart, unveröffentlichte Ergebnisse) diesbezüglich zwar verbessert, da viele kryptische Spleißstellen durch stille Mutationen eliminiert werden (Fig. 1A und B); eine Spleiß-Donor-Stelle direkt am 3'-Ende wird jedoch nicht eliminiert - sondern im Gegenteil eher verstärkt durch Kodon-Optimierung ('SD (8,9)' in Abb 1B). Wenn man die Basensequenz an dieser Position betrachtet (Fig. 3), wird offensichtlich, daß durch stille Mutation keine Eliminierung dieser SD möglich ist: jedes für Valin kodierende Kodon (GTN) an AS-Position 336 des Wildtyps beinhaltet die für das Spleiß-Ereignis zwei kritischen Basen GT. Es wurde eine Mutation eingeführt, welche die kritische GT-Sequenz zerstört (GTG nach GCG, Austausch an Basenposition 1007, bezogen auf die kodierende Basensequenz der Wildtyp-Cre-Sequenz, vgl. Sternberg et al., 1986) und dabei ein konservativer Aminosäure-Austausch von Valin nach Alanin in Kauf genommen. Diese Mutation wurde sowohl in P1-Cre eingeführt (Fig. 3C), als auch in hCre (Fig. 3D); in hCreV336A sind somit sämtliche kryptischen SD-Stellen am 3'-Ende eliminiert (Fig.3D), in P1-CreV336A ist noch eine SD vorhanden (Fig. 3C).

[0012] Unter Verwendung einer loxP-Stop-loxP-lacZ-enthaltenden Reporter-Zell-Linie (Kellendonk et al. 1999) wurden die Konstrukte quantitativ auf ihre Induzierbarkeit, insbesondere Cre-Aktivität in Abwesenheit des Induktors, hin untersucht (Fig. 4). Das durch die V336A-Mutation optimierte hCre-PR-kodierende Konstrukt zeigt tatsächlich einen fast nicht mehr meßbaren Hintergrund (Fig. 4C)- um ca. den Faktor 10 niedriger als das nicht mutierte Konstrukt (Fig. 4B). Dementsprechend verbessert sich die Induzierbarkeit von ca. 10- bis 15-fach auf 76- bis 165-fach. Die Einführung der Mutation V336A in die P1-Cre-Sequenz resultiert in einer Hintergrundaktivität (Fig. 5B), die zwischen der von dem mutierten hCre-Konstrukt (Fig. 5C) und der vom unmutierten P1-Cre (Fig. 5A) liegt. Dies könnte auf die in diesem auf P1-Cre basierenden Konstrukt enthaltenen weiteren kryptischen Spleißstellen zurückzuführen sein (vgl. Fig. 6C). Die maximale Erniedrigung des Hintergrunds rührt von dem Konstrukt mit den wenigsten kryptischen Donorstellen her, nämlich hCreV336A-PR (vgl. Fig. 6D).

[0013] Eine weitere Verbesserung konnte in Bezug auf die maximale Aktivität erreicht werden. Die in Fig.4 dargestellten Cre-PR-Fusionsproteine weisen eine maximale Aktivität von lediglich 30-40 % auf - gemessen an konstitutiv

aktivem, unfusioniertem Cre. Aus früheren Untersuchungen in unserem Labor war bekannt, daß andere Varianten von Cre-PR (z.B. Cre-PR650-914) eine deutlich höhere Aktivität aufweisen - bis über 50 % von Cre. Allerdings weisen diese Konstrukte immer auch einen sehr hohen Hintergrund auf (siehe Fig. 5D) und sind deswegen für den Einsatz im transgenen Tier kaum geeignet. Durch Einführung der oben beschriebenen Mutation V336A in diese Cre-PR-Variante kann der unerwünschte Hintergrund reduziert werden auf wiederum nahezu unmeßbares Niveau bei gleichbleibend hoher Aktivität von über 40 % (Fig. 5E).

[0014] Bei der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz (wie vorstehend unter (1) definiert) ist die Cre-Proteinsequenz ändernde Basenmutation, durch die die kryptische Spleißstelle in der Cre-DNA-Sequenz ausgeschaltet wird, vorzugsweise ein Basenaustausch, in dem das Kodon GTG in der vorstehend unter (1) definierten kryptischen Spleißstellensequenz durch ein Kodon XYZ ersetzt ist, wobei X, Y und Z unabhängig voneinander die Nukleotide A, T, C oder G sind, mit der Maßgabe, daß wenn X = G, dann Y ≠ T (d. h., wenn Y = T, dann X ≠ G). Dies bedeutet, daß jede Sequenz, die die nicht für den Spleißvorgang kritische Sequenz GT an dieser Position enthält, geeignet ist. Dabei sind insbesondere solche Basensequenzen bevorzugt, die zu einem konservativen Aminosäureaustausch in der resultierenden Proteinsequenz führen. Da die Sequenz GTG für Val kodiert, bedeutet dies, daß insbesondere aliphatische Aminosäuren wie Alanin (XYZ ist GCN), Leucin (XYZ ist CTN, TTA, TTG) und Ile (XYZ ist ATA, ATC oder ATT) kodierende Sequenzen bevorzugt sind. Bevorzugte DNA-Sequenzen weisen die in SEQ ID NOs: 13 und 14 gezeigten Teilsequenzen auf.

[0015] Darüber hinaus können in der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz noch andere in der Wildtypsequenz vorhandene kryptische Spleißstellen durch stille Mutation und/oder durch die Cre-Proteinsequenz ändernde Basenmutationen ausgeschaltet sein. Geeignete Positionen für solche Mutationen sind Fig. 1 und 6 zu entnehmen.

[0016] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die für die Cre-Mutante kodierende DNA-Sequenz noch am 5'-Ende, bezogen auf die Cre-Wildtypsequenz, trunkiert. Dabei ist jede Trunkierung, die die Funktionalität des resultierenden Cre-Proteins nicht beeinflußt, geeignet. Es ist jedoch bevorzugt, daß die Nukleotide, die der Position 1 bis 54, vorzugsweise 1 bis 15 des Wildtyps entsprechen, trunkiert sind.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die für die Cre-Mutante kodierende DNA-Sequenz noch am 5'-Ende modifiziert. "Modifiziert" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet dabei, daß sowohl zusätzliche Nukleobasen an das 5'-Ende des untrunkierten wie auch an das 5'-Ende des wie vorstehend definierten trunkierten Cre DNA-Sequenz angefügt sein können. Bei diesen zusätzlichen Nukleobasen handelt es sich um Kodons, die für Aminosäuren kodieren, die sich gemäß der sogenannten N-End-Regel stabilisierend auf das Gesamtprotein auswirken sollen (Lévy, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4907 - 4912 (1996)). Solche stabilisierende Aminosäuresequenzen bestehen im wesentlichen aus neutralen Aminosäuren, vorzugsweise aus Met, Gly, Val und Ala. Es sind dabei Sequenzen, die Kombinationen dieser Aminosäuren enthalten und homogene Sequenzen einer der genannten Aminosäuren möglich. Die Länge der stabilisierenden Aminosäuresequenzen beträgt vorzugsweise 1 bis 10 Aminosäuren (entspricht 3 bis 30 Nukleobasen), insbesondere 1 bis 3 Aminosäuren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die DNA-Sequenz die unmittelbar am Translationsstart beginnende Sequenz ATG GGC GCC (kodierend für Met-Gly-Ala).

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die erfindungsgemäße DNA-Sequenz die Nukleobasen 1 bis 984 der SEQ ID NO: 5, 7 oder 9.

[0019] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die DNA-Sequenz am 3'-Terminus, bezogen auf die Wildtypsequenz, trunkiert. Im Sinne der vorliegenden Erfindung können dabei 1 bis 24 Nukleotide, bezogen auf die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Wildtypsequenz, trunkiert sein (d. h. eine Trunkierung nach der in Position 1006 - 1008 befindlichen, die Cre-Proteinsequenz ändernden Mutation). Auch Deletionen einzelner Kodons stromab des Kodons 1006 - 1008 sind gemäß der vorliegenden Erfindung möglich.

[0020] In der für die ein Fusionsprotein kodierenden DNA-Sequenz ist das funktionelle Protein ausgewählt aus der Gruppe der Proteine, bestehend aus Enzymen, Peptidhormonen, pharmakologisch wirksamen Peptiden und Strukturproteinen. Die DNA-Sequenzen, die für die funktionellen Proteine kodieren, können dabei sowohl stromaufwärts oder stromabwärts der für die Cre-Mutante kodierenden DNA-Sequenz liegen. Die stabilisierende Wirkung der erfindungsgemäßen Cre-Mutantensequenz kommt jedoch besonders dann zum Tragen, wenn sich die für das funktionelle Protein kodierende DNA-Sequenz stromabwärts der Cre-DNA-Sequenz befindet, d. h. mit dem 3'-Ende der Cre-DNA-Sequenz verknüpft ist.

[0021] Vorzugsweise ist das funktionelle Protein die ligandenbindende Domäne eines Rezeptorproteins, insbesondere eine ligandenbindende Domäne eines Stereoidrezeptors wie Progesteron-, Estrogen- oder Glukokortikoidrezeptor. Diese DNA-Sequenzen können dabei von allen Säugern, vorzugsweise von Mensch, Maus oder Ratte stammen. Besonders bevorzugt ist eine ligandenbindende Domäne eines Stereoidrezeptors, insbesondere eine, die die Nukleotide 1948 bis 2742 der in SEQ ID NO: 3 gezeigten humanen Sequenz umfaßt.

[0022] Die vorstehend definierten bevorzugten für Fusionsproteine kodierenden DNA-Sequenzen können noch weitere Fusionspartner (für funktionelle Proteine kodierende DNA-Sequenzen) enthalten, so z. B. solche, die eine erleichterte Aufreinigung (wie z. B. Glutathion-S-transferase, GST oder maltosebindendes Protein, MBP), Detektion (z. B.

grün fluoreszierendes Protein, GFP) oder Transduktion (z. B. Transduktionsdomänen von HIV-TAT oder VP22) ermöglichen. Daneben betrifft die vorliegende Erfindung auch DNA-Sequenzen, die für Fusionsproteine kodieren, die die erfindungsgemäße Cre-Sequenz und die genannten weiteren Fusionspartner umfassen.

[0023] Weiterhin ist bevorzugt, daß in dem Fusionsprotein die Linkersequenz zwischen der Cre-Domäne und der für das funktionelle Protein, insbesondere für die ligandenbindenden Domäne kodierende DNA-Sequenz möglichst kurz und/oder mutiert ist, damit die Zugänglichkeit für Proteasen erschwert ist. Für die diese Fusionsproteine kodierenden DNA-Sequenzen bedeutet dies, daß - falls sich die für das funktionelle Protein (bzw. die ligandenbindende Domäne) kodierende DNA stromabwärts der Cre-DNA-Sequenz befindet - der Bereich nach der mutierten kryptischen Spleißstelle (bei Position 1006 - 1008, bezogen auf die Wildtypsequenz) bis zum Ende der Cre-Sequenz bzw. bis zum funktionellen Beginn der ligandenbindenden Domäne, wie vorstehend definiert, ganz oder teilweise deletiert und/oder mutiert sein kann. Unter "mutiert" ist dabei auch zu verstehen, daß die ursprüngliche DNA-Sequenz durch eine kurze DNA-Sequenz ersetzt wird, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die im wesentlichen aus neutralen Aminosäuren wie Gly, Ala, Val, Pro oder Ile, insbesondere Gly und Pro, kodiert. Die Länge der Aminosäuresequenz liegt dabei insbesondere im Bereich von 1 bis 10, vorzugsweise 1 bis 5 Aminosäuren.

[0024] Vorzugsweise sind ebenfalls die in der ligandenbindenden Domäne kodierenden Sequenz vorkommenden Spleißstellen durch stille Mutation oder durch eine die Proteinsequenz der ligandenbindenden Domäne ändernden Basenmutation ausgeschaltet. Besonders bevorzugte Sequenzen sind die in den SEQ ID NOs: 5, 7 und 9 gezeigten DNA-Sequenzen.

[0025] Der erfindungsgemäße Vektor, wie vorstehend unter (3) definiert, kann neben der DNA-Sequenz (1) und/oder (2) noch weitere funktionelle Sequenzen wie die vorstehend definierten Sequenzen, die die Aufreinigung, Detektion oder Transduktion ermöglichen, enthalten. Weiterhin kann er auch Promotorsequenzen enthalten, die eine Expression z.B. in Bakterien oder Hefen, bzw. Schmetterlingszellen ermöglichen oder eine Expression in transgenen Lebewesen wie vorstehend definiert. Daneben kann der Vektor Replikationsursprünge, Selektionsmarker sowie multiple Klonierungsstellen o. ä. beinhalten.

[0026] Die erfindungsgemäßen Mikroorganismen oder transgene Lebewesen können sowohl mit dem vorstehend definierten erfindungsgemäßen Vektor transformiert sein, als auch die erfindungsgemäße DNA-Sequenz chromosomal integriert aufweisen. Als Mikroorganismen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind dabei sowohl Prokaryonten als auch Eukaryonten zu verstehen. "Lebewesen" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind dabei Wirbeltiere, insbesondere Säuger (und hiervon insbesondere Nagetiere wie Mäuse oder Ratten) oder Fische oder Nichtwirbeltiere wie Würmer und Fliegen.

[0027] Die erfindungsgemäße Cre-Mutante oder das erfindungsgemäße Cre-Fusionsprotein kann neben den vorstehend definierten Sequenzen auch noch weitere proteinogene Strukturen enthalten oder auch mit nichtproteinogenen Strukturen verknüpft sein.

[0028] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der Cre-Mutante oder des Cre-Fusionsproteins kann, wie vorstehend definiert, durch Kultivieren eines mit einem geeigneten Vektor transformierten Mikroorganismusses bewirkt werden. Die Zielproteine können dann gemäß dem Fachmann geläufigen Verfahren aus der Kultur isoliert und aufgereinigt werden.

[0029] Die Erfindung hat besondere Bedeutung für die Weiterentwicklung des induzierbaren, konditionalen 'gene-targeting'. Unter konditionalem gene-targeting versteht man die gezielte Mutagenese eines Gens in einem frei wählbaren Zelltyp bzw. Gewebe; die Mutagenese kann ggf. unter Verwendung eines induzierbaren Systems auch zu einem beliebigen Zeitpunkt erfolgen. Diese Modifikationen des klassischen gene-targeting sind insbesondere wichtig, wenn die bereits in Keimzellen auftretende Mutation unerwünschte Nebenwirkungen zeigt. Unter Anwendung der Erfindung können transgene Tiere - vorzugsweise Mäuse - hergestellt werden, die ein posttranslational induzierbares Cre-Fusionsprotein exprimieren. Nach Kreuzung mit einer Mauslinie, welche eine loxP-enthaltende target-Sequenz trägt, können über Zugabe des Induktors zu einem gewünschten Zeitpunkt gezielte Veränderungen im Genom - wie z.B. Deletionen, Inversionen oder Translokationen - vorgenommen werden. Der besondere Vorteil der Erfindung liegt dabei in der beschriebenen niedrigen Cre-Rekombinase-Aktivität vor Zugabe des Induktors. Dadurch ist im transgenen Tier keine unerwünschte (d.h. vor Induktorzugabe auftretende) Modifikation des Genotyps zu erwarten. Eine derartige Cre-Hintergrund-Aktivität erschwert bislang die eindeutige Festlegung des Genotyps vor bzw. nach der Induktion. Je nach Spezifität des im Transgen verwendeten Promotors kann die Expression des induzierbaren Cre entweder zelltyp- bzw. Gewebe-spezifisch oder ubiquitär erfolgen. Im letzteren Fall erhält man ein transgenes Tier, welches die zeitliche Kontrolle über die Mutagenese in jedem Gewebe- bzw. Zelltyp erlaubt. Kontrolle hinsichtlich der Zeit und des Ortes werden durch die Verwendung zelltyp-spezifischer Promotoren ermöglicht. Die Transgenkonstrukte können entweder über Mikroinjektion zur Generierung transgener Linien benutzt werden oder über homologe Rekombination in ausgewählte Bereiche des Genoms integriert werden.

[0030] Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiele

[0031] In den nachfolgend beschriebenen Beispielen wurden die folgenden Primer und Matrizen verwendet:

Primer:

3Bsicre343 AAATTCGTACGCATCGCCATCTTCCAGCAGG
 3Narc343 AAATTGGCGCCATCGCCATCTTCCAGCAGG
 3Kascre343 AATTTGGCGCCGTCCCCATCCTCGAGCAG
 3Sfomutcre343 AAATTGGCGCCATCGCCATCTTCCAGCAGGCGCGCCATT

3Sfomutsshcre343 GCCCC
 AAATTGGCGCCGTCCCCATCCTCGAGCAGCCTCGCCATG
 GCCCC
 5Bamhcre2 GGGGGATCCACCATGGGTGCCTCCAACCTGCTGACTGTG
 5Bamhcre19 TTTAAGGATCCACCATGGGTGCCACGAGTGATGAGGTTG
 GCA
 5Bsicre19 TTTAACGTACGGCACGAGTGATGAGGTTGCGA
 5Narc19 TTTAAGGCGCCACGAGTGATGAGGTTGCGA

Matrizen:

pGKCrebpA
 pBluehCre

Institut für Genetik, Universität zu Köln.
 Seeburg, MPI für med. Forschung,
 Heidelberg & Stewart, EMBL, Heidelberg.
 Institut für Genetik, Universität zu Köln.
 Institut für Genetik, Universität zu Köln.
 Artemis, Köln.

Beispiel 1: Klonierungsschritt I: LBD in pNN

[0032] Im ersten Klonierungsschritt wurden die verschiedenen Längen der LBD des PR und des ER in pNN265E-bpA (erhältlich Institut für Genetik, Univ. zu Köln) kloniert. Die Klonierung wurde über die im Vektor nur einmal schneidenden Restriktionsenzyme BamHI und EcoRV durchgeführt, die über PCR auch in die Amplifikate eingeführt wurden.

[0033] Unterschiedliche Längen der LBD des PR wurden durch 5'- und 3'-terminale Trunkierungen generiert. Die 5'-Trunkierungen begannen bei AS650, AS 676 und AS678 des PR. Durch Beginn der PR-LBD bei Leu650 wird die D-Domäne der LBD um 10 AS verkürzt. Dieser N-Terminus wurde gewählt, da solche Konstrukte in Kontext mit Cre erfahrungsgemäß hohe Aktivitäten aufweisen (Kellendonk et al., Nucl. Acid Res. 24, 1404-1411 (1996)). Eine zweite N-terminale Trunkierung erfolgte bis zu Ser676 des PR. Dies basierte auf dem Befund von Kellendonk et al. (1996) und daraus resultierende Überlegungen: Je weniger AS der D-Domäne des PR als Linker zwischen Cre und LBD, desto geringere Hintergrundaktivität der Fusionsproteine. Es wurden u. a. die AS 641, 672 und 687 als Startpunkte für die LBD getestet (Kellendonk et al., 1996). PR641 zeigte in Kontext mit Cre hohe Aktivität, aber auch hohen Hintergrund. Dagegen zeigte PR672 etwas weniger Aktivität und auch weniger Hintergrund als PR641. PR687 zeigte kaum noch Aktivität. Daher wurde der Startpunkt des Ser676-Konstrukts zwischen AS672 und AS687 gelegt, in der Erwartung, daß eine hohe Aktivität von Cre beibehalten wird und auch der Hintergrund auf tolerierbarem, niedrigem Niveau bleibt. Zusätzlich sind bei Ser676-Konstrukten im Gegensatz zu Leu650 auf Sequenzebene zwei starke Spleiß-Akzeptoren (SA) für mögliches kryptisches Spleißen abgewandelt worden. Ein SA wird durch Deletion der Sequenz eliminiert. Der zweite SA wird derart in seiner Konsensus-Sequenz verändert, daß der C/T-reiche Sequenzabschnitt in diesem Konstrukt fehlt. Zudem wurde im Linkerbereich darauf geachtet, mögliche Proteaseerkennung-AS wie z. B. Arg, Lys zu deletieren. Bei der dritten 5'-Trunkierungsvariante Gly678 wurde die restliche Sequenz des zweiten SA,

EP 1 170 364 A1

die in Ser 676 noch vorhanden ist, deletiert. Um Cre-Aktivität in solchen Konstrukten durch Verkürzung des Linkers nicht noch weiter einzuschränken, wurden anstatt des Ser676 und des Pro677 zwei Glycine eingeführt, die auch die Flexibilität des Linkers steigern sollen.

Beispiel 2: Klonierung von Cre19 an den N- oder C-Terminus der LBD

[0034] Die ungerichtete Klonierung von Cre19 an den N-Terminus der LBD erfolgte über die KasI-Schnittstelle. Das an der Matrize pGKCrebpA amplifizierte Insert (Tab. 1) wurde mit KasI verdaut und in KasI geschnittene und danach dephosphorylierte pNN-Vektoren mit LBD einligiert. Zudem wurde Cre19 an das C-terminale Ende der LBD ungerichtet über die BsiWI-Schnittstelle der pNN-Vektoren mit den verschiedenen LBD des PR und ER kloniert. Hierzu wurde die Cre19-Sequenz über PCR mit den in Tab. 1 dargestellten Primern an der Matrize pGKCrebpA amplifiziert, mit BsiWI geschnitten und in BsiWI geschnittene, dephosphorylierte pNN-Vektoren einligiert.

Tabelle 1:

verwendete Primersequenzen			
	5'-Primer	3'-Primer	Matrize
N-terminales Cre19	5Nacre19	3Nacre343	pGKCrebpA
c-terminales Cre19	5Bsicre19	3Bsicre343	pGKCrebpA

Beispiel 3: Klonierung des hCre an den N-Terminus von PR676-914

[0035] Da Cre ein Phagenprotein ist und die Sequenz dadurch auf die prokaryotische Translationsmaschinerie abgestimmt ist, wurde versucht, eine Optimierung für das eukaryontische Expressionssystem zu erzielen. R. Sprengel optimierte in Zusammenarbeit mit F. Stewart die Sequenz von Cre entsprechend, um somit eine verbesserte Translationseffizienz zu erhalten. Die so veränderte Cre-Sequenz nannte er humanisiertes Cre (hCre) (F. Stewart, unveröffentlichte Daten). Nachdem sich herausstellte, daß das Konstrukt pNNCre19PR676-914 in Zellkultur die bisher besten Cre-Aktivitäten zeigte, wurde in diesem Konstrukt an Stelle des normalen Cre19 ein hCre eingefügt.

[0036] Die Sequenzen von hCre2 und hCre19 wurden jeweils N-terminal an PR676-914 gerichtet kloniert. Die PCR des hCre19 und hCre2 wurde mit den in Tab. 2 angegebenen Primern an der Matrize pBluehCre vorgenommen, die Amplifikate BamHI/KasI geschnitten und in einen BamHI/KasI geschnittenen pNNCre19PR676-914 ligiert.

Tabelle 2:

verwendete Primersequenzen			
	5'-Primer	3'-Primer	Matrize
N-terminales hCre2	5Bamhcre2	3Kascre343	pBluehCre
N-terminales hCre19	5Bamhcre19	3Kascre343	pBluehCre

Beispiel 4: Klonierung des Cre19V336A

[0037] Die Mutation V336A wurde in die Phagen-Cre19-Sequenz eingeführt. Dazu wurde die Cre-Sequenz mit dieser Mutation, nachfolgend Cre19V336A genannt, N-terminal an die PR676-914-Sequenz kloniert.

[0038] Die Mutation V336A wurde durch den in Tab. 3 aufgeführten 3'-Primer in die Cre19-Sequenz eingeführt. Das Amplifikat wurde an der Matrize pNN-Cre19PR676-914 amplifiziert und über die SfoI-Schnittstellen in einen SfoI geschnittenen, nachfolgend dephosphorylierten pNNCre19PR676-914 ungerichtet kloniert. Durch Verdau mit BamHI konnte die richtige Orientierung des Cre19V336A im Vektor gezeigt werden. Die Mutation wurde über Sequenzierung nachgewiesen.

Tabelle 3:

verwendete Primersequenzen			
	5'-Primer	3'-Primer	Matrize
Cre19V336A	5Nacre19	3Sfomutcre343	pNNCre19PR676-914

EP 1 170 364 A1

Beispiel 5: Klonierung des hCre19V336A

[0039] Die Mutation V336A wurde über den in Tab. 4 aufgeführten 3'-Primer in die Sequenz des hCre19 eingeführt. Über die mittels PCR an der Matrize pNNhCre19PR676-914 eingeführten Klonierungsstellen BamHI und SfoI wurde das hCre19V336A in einen BamHI/SfoI geschnittenen pNNCre19PR676-914 kloniert. Die Mutation wurde über Sequenzierung nachgewiesen.

Tabelle 4:

	5'-Primer	3'-Primer	Matrize
hCre19V336A	5Bamhhcre19	3Sfomutsshcre343	pNNhCre19PR676-914

Beispiel 6: Aktivitätstest von Cre19-PR676-914, hCre19-PR676-914 und hCre19V336A-PR676-914

[0040] Es wurden am Vortag in Löchern von 6-Loch-Platten (8×10^4 Zellen/6-Loch/Transfektion) ausgesäte CV1-5B-Zellen im Triplikat mit $1 \mu\text{g}$ der jeweiligen Fusionsproteinplasmide und $1 \mu\text{g}$ pHD2-AP transfiziert. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert und zu gleichen Teilen auf 2 Löcher einer 12-Loch Platte aufgeteilt. Das eine Loch wurde mit 100 nM RU486 (erhältlich von Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) in Medium versetzt, das andere mit Leer-Medium. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und gegen β -Galactosidase und Alkalische Phosphatase (zur Normalisierung gegen Transfektionseffizienz) gefärbt. Der prozentuale Abgleich erfolgte gegen parallel transfizierten pNN-CMV-Cre (Cre ohne Fusionspartner im gleichen Vektor). Dazu wurde der Mittelwert von CMV-Cre auf 100% gesetzt und die Mittelwerte für die Fusionsproteine daran abgeglichen. Das Ergebnis ist in Figur 4 zusammengefaßt.

EP 1 170 364 A1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> ARTEMIS Pharmaceuticals GmbH

<120> Mutation kryptischer Spleißstellen in Cre und
Cre-Fusionsproteinen zur Verbesserung der Expression
und Induzierbarkeit

<130> 992876de/JH/ml

<140>

<141>

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1032

<212> DNA

<213> Bacteriophage P1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1029)

<400> 1

atg	tcc	aat	tta	ctg	acc	gta	cac	caa	aat	ttg	cct	gca	tta	ccg	gtc	48
Met	Ser	Asn	Leu	Leu	Thr	Val	His	Gln	Asn	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Val	
1				5					10					15		

gat	gca	acg	agt	gat	gag	gtt	cgc	aag	aac	ctg	atg	gac	atg	ttc	agg	96
Asp	Ala	Thr	Ser	Asp	Glu	Val	Arg	Lys	Asn	Leu	Met	Asp	Met	Phe	Arg	
			20					25					30			

gat	cgc	cag	gcg	ttt	tct	gag	cat	acc	tgg	aaa	atg	ctt	ctg	tcc	gtt	144
Asp	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	His	Thr	Trp	Lys	Met	Leu	Leu	Ser	Val	
		35					40						45			

tgc	ccg	tcg	tgg	gcg	gca	tgg	tgc	aag	ttg	aat	aac	cgg	aaa	tgg	ttt	192
Cys	Arg	Ser	Trp	Ala	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu	Asn	Asn	Arg	Lys	Trp	Phe	
	50					55					60					

ccc	gca	gaa	cct	gaa	gat	gtt	cgc	gat	tat	ctt	cta	tat	ctt	cag	gcg	240
Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Arg	Asp	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Leu	Gln	Ala	
	65				70				75						80	

cgc	ggt	ctg	gca	gta	aaa	act	atc	cag	caa	cat	ttg	ggc	cag	cta	aac	288
Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Thr	Ile	Gln	Gln	His	Leu	Gly	Gln	Leu	Asn	
				85					90					95		

atg	ctt	cat	cgt	cgg	tcc	ggg	ctg	cca	cga	cca	agt	gac	agc	aat	gct	336
Met	Leu	His	Arg	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Ser	Asp	Ser	Asn	Ala	
			100					105					110			

gtt	tca	ctg	gtt	atg	cgg	cgg	atc	cga	aaa	gaa	aac	gtt	gat	gcc	ggc	384
Val	Ser	Leu	Val	Met	Arg	Arg	Ile	Arg	Lys	Glu	Asn	Val	Asp	Ala	Gly	
		115					120					125				

EP 1 170 364 A1

	gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac cag	432
	Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	
	130 135 140	
5	gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt aat	480
	Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn	
	145 150 155 160	
10	ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc ctg tta cgt ata gcc gaa	528
	Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu	
	165 170 175	
15	att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca cgt act gac ggt ggg aga	576
	Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg	
	180 185 190	
20	atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg ctg gtt agc acc gca ggt	624
	Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly	
	195 200 205	
25	gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act aaa ctg gtc gag cga tgg	672
	Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp	
	210 215 220	
30	att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat ccg aat aac tac ctg ttt tgc	720
	Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys	
	225 230 235 240	
35	cgg gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca tct gcc acc agc cag cta	768
	Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu	
	245 250 255	
40	tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa gca act cat cga ttg att	816
	Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile	
	260 265 270	
45	tac ggc gct aag gat gac tct ggt cag aga tac ctg gcc tgg tct gga	864
	Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly	
	275 280 285	
50	cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat atg gcc cgc gct gga gtt	912
	His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val	
	290 295 300	
55	tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc tgg acc aat gta aat att	960
	Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile	
	305 310 315 320	
60	gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt gaa aca ggg gca atg gtg	1008
	Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val	
	325 330 335	
65	cgc ctg ctg gaa gat ggc gat tag	1032
	Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp	
	340	
70	<210> 2	
	<211> 343	
	<212> PRT	
75	<213> Bacteriophage P1	

EP 1 170 364 A1

<400> 2
Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
1 5 10 15
5 Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
20 25 30
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
35 40 45
10 Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
50 55 60
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
65 70 75 80
15 Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
85 90 95
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
100 105 110
20 Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
115 120 125
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
130 135 140
25 Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
145 150 155 160
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
165 170 175
30 Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
180 185 190
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
195 200 205
35 Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
210 215 220
40 Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
225 230 235 240
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
245 250 255
45 Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
260 265 270
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly
275 280 285
50 His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
290 295 300
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
305 310 315 320
55

EP 1 170 364 A1

Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
325 330 335

Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp
340

<210> 3
<211> 2802
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2799)

<400> 3

atg act gag ctg aag gca aag ggt ccc cgg gct ccc cac gtg gcg ggc	48
Met Thr Glu Leu Lys Ala Lys Gly Pro Arg Ala Pro His Val Ala Gly	
1 5 10 15	
ggc ccg ccc tcc ccc gag gtc gga tcc cca ctg ctg tgt cgc cca gcc	96
Gly Pro Pro Ser Pro Glu Val Gly Ser Pro Leu Leu Cys Arg Pro Ala	
20 25 30	
gca ggt ccg ttc ccg ggg agc cag acc tcg gac acc ttg cct gaa gtt	144
Ala Gly Phe Pro Gly Ser Gln Thr Ser Asp Thr Leu Pro Glu Val	
35 40 45	
tcg gcc ata cct atc tcc ctg gac ggg cta ctc ttc cct cgg ccc tgc	192
Ser Ala Ile Pro Ile Ser Leu Asp Gly Leu Leu Phe Pro Arg Pro Cys	
50 55 60	
cag gga cag gac ccc tcc gac gaa aag acg cag gac cag cag tcg ctg	240
Gln Gly Gln Asp Pro Ser Asp Glu Lys Thr Gln Asp Gln Gln Ser Leu	
65 70 75 80	
tcg gac gtg gag ggc gca tat tcc aga gct gaa gct aca agg ggt gct	288
Ser Asp Val Glu Gly Ala Tyr Ser Arg Ala Glu Ala Thr Arg Gly Ala	
85 90 95	
gga ggc agc agt tct agt ccc cca gaa aag gac agc gga ctg ctg gac	336
Gly Gly Ser Ser Ser Ser Pro Pro Glu Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp	
100 105 110	
agt gtc ttg gac act ctg ttg gcg ccc tca ggt ccc ggg cag agc caa	384
Ser Val Leu Asp Thr Leu Leu Ala Pro Ser Gly Pro Gly Gln Ser Gln	
115 120 125	
ccc agc cct ccc gcc tgc gag gtc acc agc tct tgg tgc ctg ttt ggc	432
Pro Ser Pro Pro Ala Cys Glu Val Thr Ser Ser Trp Cys Leu Phe Gly	
130 135 140	
ccc gaa ctt ccc gaa gat cca ccg gct gcc ccc gcc acc cag ccg gtg	480
Pro Glu Leu Pro Glu Asp Pro Pro Ala Ala Pro Ala Thr Gln Arg Val	
145 150 155 160	

EP 1 170 364 A1

	ttg	tcc	ccg	ctc	atg	agc	cgg	tcc	ggg	tgc	aag	gtt	gga	gac	agc	tcc	528
	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Arg	Ser	Gly	Cys	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Ser	
					165					170					175		
5	ggg	acg	gca	gct	gcc	cat	aaa	gtg	ctg	ccc	cgg	ggc	ctg	tca	cca	gcc	576
	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	His	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Gly	Leu	Ser	Pro	Ala	
				180					185					190			
	cgg	cag	ctg	ctg	ctc	ccg	gcc	tct	gag	agc	cct	cac	tgg	tcc	ggg	gcc	624
10	Arg	Gln	Leu	Leu	Leu	Pro	Ala	Ser	Glu	Ser	Pro	His	Trp	Ser	Gly	Ala	
			195					200					205				
	cca	gtg	aag	ccg	tct	ccg	cag	gcc	gct	gcg	gtg	gag	gtt	gag	gag	gag	672
	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Pro	Gln	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	
		210					215					220					
15	gat	ggc	tct	gag	tcc	gag	gag	tct	gcg	ggt	ccg	ctt	ctg	aag	ggc	aaa	720
	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Glu	Glu	Ser	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Lys	Gly	Lys	
	225					230					235					240	
	cct	cgg	gct	ctg	ggt	ggc	gcg	gcg	gct	gga	gga	gga	gcc	gcg	gct	gtc	768
20	Pro	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	
				245						250					255		
	ccg	ccg	ggg	gcg	gca	gca	gga	ggc	gtc	gcc	ctg	gtc	ccc	aag	gaa	gat	816
	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Leu	Val	Pro	Lys	Glu	Asp	
25				260					265					270			
	tcc	cgc	ttc	tca	gcg	ccc	agg	gtc	gcc	ctg	gtg	gag	cag	gac	gcg	ccg	864
	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Pro	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Glu	Gln	Asp	Ala	Pro	
			275					280					285				
	atg	gcg	ccc	ggg	cgc	tcc	ccg	ctg	gcc	acc	acg	gtg	atg	gat	ttc	atc	912
30	Met	Ala	Pro	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Thr	Thr	Val	Met	Asp	Phe	Ile	
		290					295					300					
	cac	gtg	cct	atc	ctg	cct	ctc	aat	cac	gcc	tta	ttg	gca	gcc	cgc	act	960
35	His	Val	Pro	Ile	Leu	Pro	Leu	Asn	His	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Arg	Thr	
	305					310				315						320	
	cgg	cag	ctg	ctg	gaa	gac	gaa	agt	tac	gac	ggc	ggg	gcc	ggg	gct	gcc	1008
	Arg	Gln	Leu	Leu	Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	
					325					330					335		
40	agc	gcc	ttt	gcc	ccg	ccg	cgg	agt	tca	ccc	tgt	gcc	tcg	tcc	acc	ccg	1056
	Ser	Ala	Phe	Ala	Pro	Pro	Arg	Ser	Ser	Pro	Cys	Ala	Ser	Ser	Thr	Pro	
				340					345					350			
	gtc	gct	gta	ggc	gac	ttc	ccc	gac	tgc	gcg	tac	ccg	ccc	gac	gcc	gag	1104
45	Val	Ala	Val	Gly	Asp	Phe	Pro	Asp	Cys	Ala	Tyr	Pro	Pro	Asp	Ala	Glu	
			355					360					365				
	ccc	aag	gac	gac	gcg	tac	cct	ctc	tat	agc	gac	ttc	cag	ccg	ccc	gct	1152
	Pro	Lys	Asp	Asp	Ala	Tyr	Pro	Leu	Tyr	Ser	Asp	Phe	Gln	Pro	Pro	Ala	
50			370				375					380					
	cta	aag	ata	aag	gag	gag	gag	gaa	ggc	gcg	gag	gcc	tcc	gcg	cgc	tcc	1200
	Leu	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Ser	Ala	Arg	Ser	
	385					390					395					400	
55																	

EP 1 170 364 A1

	ccg	cgt	tcc	tac	ctt	gtg	gcc	ggg	gcc	aac	ccc	gca	gcc	ttc	ccg	gat	1248
	Pro	Arg	Ser	Tyr	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Asn	Pro	Ala	Ala	Phe	Pro	Asp	
					405					410					415		
5	ttc	ccg	ttg	ggg	cca	ccg	ccc	ccg	ctg	ccg	ccg	cga	gcg	acc	cca	tcc	1296
	Phe	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Arg	Ala	Thr	Pro	Ser	
				420					425					430			
	aga	ccc	ggg	gaa	gcg	gcg	gtg	acg	gcc	gca	ccc	gcc	agt	gcc	tca	gtc	1344
10	Arg	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Val	
				435				440						445			
	tcg	tct	gcg	tcc	tcc	tcg	ggg	tcg	acc	ctg	gag	tgc	atc	ctg	tac	aaa	1392
	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Tyr	Lys	
				450			455						460				
15	gcg	gag	ggc	gcg	ccg	ccc	cag	cag	ggc	ccg	ttc	gcg	ccg	ccg	ccc	tgc	1440
	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Gln	Gly	Pro	Phe	Ala	Pro	Pro	Pro	Cys		
	465					470				475					480		
	aag	gcg	ccg	ggc	gcg	agc	ggc	tgc	ctg	ctc	ccg	ccg	gac	ggc	ctg	ccc	1488
20	Lys	Ala	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Cys	Leu	Leu	Pro	Arg	Asp	Gly	Leu	Pro	
					485					490					495		
	tcc	acc	tcc	gcc	tct	gcc	gcc	gcc	gcc	ggg	gcg	gcc	ccc	gcg	ctc	tac	1536
25	Ser	Thr	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Ala	Leu	Tyr	
					500					505					510		
	cct	gca	ctc	ggc	ctc	aac	ggg	ctc	ccg	cag	ctc	ggc	tac	cag	gcc	gcc	1584
	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Asn	Gly	Leu	Pro	Gln	Leu	Gly	Tyr	Gln	Ala	Ala	
				515				520					525				
30	gtg	ctc	aag	gag	ggc	ctg	ccg	cag	gtc	tac	ccg	ccc	tat	ctc	aac	tac	1632
	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	Leu	Pro	Gln	Val	Tyr	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asn	Tyr	
				530			535					540					
	ctg	agg	ccg	gat	tca	gaa	gcc	agc	cag	agc	cca	caa	tac	agc	ttc	gag	1680
35	Leu	Arg	Pro	Asp	Ser	Glu	Ala	Ser	Gln	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	Phe	Glu	
						550					555					560	
	tca	tta	cct	cag	aag	att	tgt	tta	atc	tgt	ggg	gat	gaa	gca	tca	ggc	1728
	Ser	Leu	Pro	Gln	Lys	Ile	Cys	Leu	Ile	Cys	Gly	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	
					565					570						575	
40	tgt	cat	tat	ggg	gtc	ctt	acc	tgt	ggg	agc	tgt	aag	gtc	ttc	ttt	aag	1776
	Cys	His	Tyr	Gly	Val	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Cys	Lys	Val	Phe	Phe	Lys	
					580				585					590			
	agg	gca	atg	gaa	ggg	cag	cac	aac	tac	tta	tgt	gct	gga	aga	aat	gac	1824
45	Arg	Ala	Met	Glu	Gly	Gln	His	Asn	Tyr	Leu	Cys	Ala	Gly	Arg	Asn	Asp	
					595			600					605				
	tgc	atc	ggt	gat	aaa	atc	cgc	aga	aaa	aac	tgc	cca	gca	tgt	cgc	ctt	1872
	Cys	Ile	Val	Asp	Lys	Ile	Arg	Arg	Lys	Asn	Cys	Pro	Ala	Cys	Arg	Leu	
50					610			615					620				
	aga	aag	tgc	tgt	cag	gct	ggc	atg	gtc	ctt	gga	ggg	cga	aaa	ttt	aaa	1920
	Arg	Lys	Cys	Cys	Gln	Ala	Gly	Met	Val	Leu	Gly	Gly	Arg	Lys	Phe	Lys	
						630					635					640	
55																	

EP 1 170 364 A1

	aag ttc aat aaa gtc aga gtt gtg aga gca ctg gat gct gtt gct ctc	1968
	Lys Phe Asn Lys Val Arg Val Val Arg Ala Leu Asp Ala Val Ala Leu	
	645 650 655	
5	cca cag cca gtg ggc gtt cca aat gaa agc caa gcc cta agc cag aga	2016
	Pro Gln Pro Val Gly Val Pro Asn Glu Ser Gln Ala Leu Ser Gln Arg	
	660 665 670	
10	ttc act ttt tca cca ggt caa gac ata cag ttg att cca cca ctg atc	2064
	Phe Thr Phe Ser Pro Gly Gln Asp Ile Gln Leu Ile Pro Pro Leu Ile	
	675 680 685	
15	aac ctg tta atg agc att gaa cca gat gtg atc tat gca gga cat gac	2112
	Asn Leu Leu Met Ser Ile Glu Pro Asp Val Ile Tyr Ala Gly His Asp	
	690 695 700	
20	aac aca aaa cct gac acc tcc agt tct ttg ctg aca agt ctt aat caa	2160
	Asn Thr Lys Pro Asp Thr Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu Asn Gln	
	705 710 715 720	
25	cta ggc gag agg caa ctt ctt tca gta gtc aag tgg tct aaa tca ttg	2208
	Leu Gly Glu Arg Gln Leu Leu Ser Val Val Lys Trp Ser Lys Ser Leu	
	725 730 735	
30	cca ggt ttt cga aac tta cat att gat gac cag ata act ctc att cag	2256
	Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Ile Asp Asp Gln Ile Thr Leu Ile Gln	
	740 745 750	
35	tat tct tgg atg agc tta atg gtg ttt ggt cta gga tgg aga tcc tac	2304
	Tyr Ser Trp Met Ser Leu Met Phe Gly Leu Gly Trp Arg Ser Tyr	
	755 760 765	
40	aaa cac gtc agt ggg cag atg ctg tat ttt gca cct gat cta ata cta	2352
	Lys His Val Ser Gly Gln Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Ile Leu	
	770 775 780	
45	aat gaa cag cgg atg aaa gaa tca tca ttc tat tca tta tgc ctt acc	2400
	Asn Glu Gln Arg Met Lys Glu Ser Ser Phe Tyr Ser Leu Cys Leu Thr	
	785 790 795 800	
50	atg tgg cag atc cca cag gag ttt gtc aag ctt caa gtt agc caa gaa	2448
	Met Trp Gln Ile Pro Gln Glu Phe Val Lys Leu Gln Val Ser Gln Glu	
	805 810 815	
55	gag ttc ctc tgt atg aaa gta ttg tta ctt ctt aat aca att cct ttg	2496
	Glu Phe Leu Cys Met Lys Val Leu Leu Leu Leu Asn Thr Ile Pro Leu	
	820 825 830	
60	gaa ggg cta cga agt caa acc cag ttt gag gag atg agg tca agc tac	2544
	Glu Gly Leu Arg Ser Gln Thr Gln Phe Glu Glu Met Arg Ser Ser Tyr	
	835 840 845	
65	att aga gag ctc atc aag gca att ggt ttg agg caa aaa gga gtt gtg	2592
	Ile Arg Glu Leu Ile Lys Ala Ile Gly Leu Arg Gln Lys Gly Val Val	
	850 855 860	
70	tcg agc tca cag cgt ttc tat caa ctt aca aaa ctt ctt gat aac ttg	2640
	Ser Ser Ser Gln Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Asn Leu	
	865 870 875 880	

EP 1 170 364 A1

	cat gat ctt gtc aaa caa ctt cat ctg tac tgc ttg aat aca ttt atc	2688
	His Asp Leu Val Lys Gln Leu His Leu Tyr Cys Leu Asn Thr Phe Ile	
	885 890 895	
5	cag tcc cgg gca ctg agt gtt gaa ttt cca gaa atg atg tct gaa gtt	2736
	Gln Ser Arg Ala Leu Ser Val Glu Phe Pro Glu Met Met Ser Glu Val	
	900 905 910	
10	att gct gca caa tta ccc aag ata ttg gca ggg atg gtg aaa ccc ctt	2784
	Ile Ala Ala Gln Leu Pro Lys Ile Leu Ala Gly Met Val Lys Pro Leu	
	915 920 925	
	ctc ttt cat aaa aag tga	2802
	Leu Phe His Lys Lys	
	930	
15		
	<210> 4	
	<211> 933	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
20		
	<400> 4	
	Met Thr Glu Leu Lys Ala Lys Gly Pro Arg Ala Pro His Val Ala Gly	
	1 5 10 15	
25	Gly Pro Pro Ser Pro Glu Val Gly Ser Pro Leu Leu Cys Arg Pro Ala	
	20 25 30	
	Ala Gly Pro Phe Pro Gly Ser Gln Thr Ser Asp Thr Leu Pro Glu Val	
	35 40 45	
30	Ser Ala Ile Pro Ile Ser Leu Asp Gly Leu Leu Phe Pro Arg Pro Cys	
	50 55 60	
	Gln Gly Gln Asp Pro Ser Asp Glu Lys Thr Gln Asp Gln Gln Ser Leu	
	65 70 75 80	
35	Ser Asp Val Glu Gly Ala Tyr Ser Arg Ala Glu Ala Thr Arg Gly Ala	
	85 90 95	
	Gly Gly Ser Ser Ser Ser Pro Pro Glu Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp	
	100 105 110	
40	Ser Val Leu Asp Thr Leu Leu Ala Pro Ser Gly Pro Gly Gln Ser Gln	
	115 120 125	
	Pro Ser Pro Pro Ala Cys Glu Val Thr Ser Ser Trp Cys Leu Phe Gly	
	130 135 140	
45	Pro Glu Leu Pro Glu Asp Pro Pro Ala Ala Pro Ala Thr Gln Arg Val	
	145 150 155 160	
	Leu Ser Pro Leu Met Ser Arg Ser Gly Cys Lys Val Gly Asp Ser Ser	
	165 170 175	
50	Gly Thr Ala Ala Ala His Lys Val Leu Pro Arg Gly Leu Ser Pro Ala	
	180 185 190	
55	Arg Gln Leu Leu Leu Pro Ala Ser Glu Ser Pro His Trp Ser Gly Ala	
	195 200 205	

EP 1 170 364 A1

	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Pro	Gln	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	
	210						215					220					
5	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Glu	Glu	Ser	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Lys	Gly	Lys	
	225					230					235					240	
	Pro	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	
					245					250						255	
10	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Leu	Val	Pro	Lys	Glu	Asp		
				260				265					270				
	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Pro	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Glu	Gln	Asp	Ala	Pro	
			275					280					285				
15	Met	Ala	Pro	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Thr	Thr	Val	Met	Asp	Phe	Ile	
	290						295					300					
	His	Val	Pro	Ile	Leu	Pro	Leu	Asn	His	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Arg	Thr	
	305					310					315					320	
20	Arg	Gln	Leu	Leu	Glu	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	
					325					330						335	
	Ser	Ala	Phe	Ala	Pro	Pro	Arg	Ser	Ser	Pro	Cys	Ala	Ser	Ser	Thr	Pro	
				340					345					350			
25	Val	Ala	Val	Gly	Asp	Phe	Pro	Asp	Cys	Ala	Tyr	Pro	Pro	Asp	Ala	Glu	
			355					360					365				
	Pro	Lys	Asp	Asp	Ala	Tyr	Pro	Leu	Tyr	Ser	Asp	Phe	Gln	Pro	Pro	Ala	
	370						375					380					
30	Leu	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Ser	Ala	Arg	Ser	
	385					390					395					400	
	Pro	Arg	Ser	Tyr	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Asn	Pro	Ala	Ala	Phe	Pro	Asp	
					405					410					415		
35	Phe	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Arg	Ala	Thr	Pro	Ser	
				420					425					430			
	Arg	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ser	Val	
			435					440					445				
	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Tyr	Lys	
	450						455					460					
45	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Pro	Gln	Gln	Gly	Pro	Phe	Ala	Pro	Pro	Pro	Cys	
	465					470					475					480	
	Lys	Ala	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Cys	Leu	Leu	Pro	Arg	Asp	Gly	Leu	Pro	
					485					490					495		
50	Ser	Thr	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Ala	Leu	Tyr	
				500					505					510			
	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Asn	Gly	Leu	Pro	Gln	Leu	Gly	Tyr	Gln	Ala	Ala	
			515					520					525				

55

EP 1 170 364 A1

	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	Leu	Pro	Gln	Val	Tyr	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asn	Tyr
	530						535					540				
5	Leu	Arg	Pro	Asp	Ser	Glu	Ala	Ser	Gln	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	Phe	Glu
	545					550					555					560
	Ser	Leu	Pro	Gln	Lys	Ile	Cys	Leu	Ile	Cys	Gly	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly
					565					570					575	
10	Cys	His	Tyr	Gly	Val	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Cys	Lys	Val	Phe	Phe	Lys
				580					585					590		
	Arg	Ala	Met	Glu	Gly	Gln	His	Asn	Tyr	Leu	Cys	Ala	Gly	Arg	Asn	Asp
			595					600					605			
15	Cys	Ile	Val	Asp	Lys	Ile	Arg	Arg	Lys	Asn	Cys	Pro	Ala	Cys	Arg	Leu
	610						615					620				
	Arg	Lys	Cys	Cys	Gln	Ala	Gly	Met	Val	Leu	Gly	Gly	Arg	Lys	Phe	Lys
	625					630					635					640
20	Lys	Phe	Asn	Lys	Val	Arg	Val	Val	Arg	Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Ala	Leu
					645					650					655	
	Pro	Gln	Pro	Val	Gly	Val	Pro	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Gln	Arg
				660					665					670		
25	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Gly	Gln	Asp	Ile	Gln	Leu	Ile	Pro	Pro	Leu	Ile
			675					680					685			
	Asn	Leu	Leu	Met	Ser	Ile	Glu	Pro	Asp	Val	Ile	Tyr	Ala	Gly	His	Asp
	690						695					700				
30	Asn	Thr	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Gln
	705					710					715					720
	Leu	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Val	Val	Lys	Trp	Ser	Lys	Ser	Leu
					725					730					735	
35	Pro	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Asp	Asp	Gln	Ile	Thr	Leu	Ile	Gln
				740					745					750		
40	Tyr	Ser	Trp	Met	Ser	Leu	Met	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr
			755					760					765			
	Lys	His	Val	Ser	Gly	Gln	Met	Leu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu
	770						775					780				
45	Asn	Glu	Gln	Arg	Met	Lys	Glu	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ser	Leu	Cys	Leu	Thr
	785					790					795					800
	Met	Trp	Gln	Ile	Pro	Gln	Glu	Phe	Val	Lys	Leu	Gln	Val	Ser	Gln	Glu
					805					810					815	
50	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Asn	Thr	Ile	Pro	Leu
				820					825					830		
	Glu	Gly	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Gln	Phe	Glu	Glu	Met	Arg	Ser	Ser	Tyr
			835					840					845			
55																

EP 1 170 364 A1

Ile Arg Glu Leu Ile Lys Ala Ile Gly Leu Arg Gln Lys Gly Val Val
850 855 860

5 Ser Ser Ser Gln Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Asn Leu
865 870 875 880

His Asp Leu Val Lys Gln Leu His Leu Tyr Cys Leu Asn Thr Phe Ile
885 890 895

10 Gln Ser Arg Ala Leu Ser Val Glu Phe Pro Glu Met Met Ser Glu Val
900 905 910

Ile Ala Ala Gln Leu Pro Lys Ile Leu Ala Gly Met Val Lys Pro Leu
915 920 925

15 Leu Phe His Lys Lys
930

<210> 5
<211> 1725
20 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
25 Fusionsprotein Bacteriophage
P1-Cre19V336A-PR676-914

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1722)

30 <400> 5
atg ggc gcc acg agt gat gag gtt cgc aag aac ctg atg gac atg ttc 48
Met Gly Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe
1 5 10 15

35 agg gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg aaa atg ctt ctg tcc 96
Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser
20 25 30

40 gtt tgc cgg tcg tgg gcg gca tgg tgc aag ttg aat aac cgg aaa tgg 144
Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp
35 40 45

45 ttt ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat ctt cta tat ctt cag 192
Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln
50 55 60

50 gcg cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa cat ttg ggc cag cta 240
Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu
65 70 75 80

55 aac atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga cca agt gac agc aat 288
Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn
85 90 95

gct gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa gaa aac gtt gat gcc 336
Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala
100 105 110

EP 1 170 364 A1

	ggt gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa cgc act gat ttc gac	384
	Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp	
	115 120 125	
5	cag gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc tgc cag gat ata cgt	432
	Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg	
	130 135 140	
10	aat ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc ctg tta cgt ata gcc	480
	Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala	
	145 150 155 160	
15	gaa att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca cgt act gac ggt ggg	528
	Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly	
	165 170 175	
20	aga atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg ctg gtt agc acc gca	576
	Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala	
	180 185 190	
25	ggt gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act aaa ctg gtc gag cga	624
	Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg	
	195 200 205	
30	tgg att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat ccg aat aac tac ctg ttt	672
	Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe	
	210 215 220	
35	tgc cgg gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca tct gcc acc agc cag	720
	Cys Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln	
	225 230 235 240	
40	cta tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa gca act cat cga ttg	768
	Leu Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu	
	245 250 255	
45	att tac ggc gct aag gat gac tct ggt cag aga tac ctg gcc tgg tct	816
	Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser	
	260 265 270	
50	gga cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat atg gcc cgc gct gga	864
	Gly His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly	
	275 280 285	
55	gtt tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc tgg acc aat gta aat	912
	Val Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn	
	290 295 300	
60	att gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt gaa aca ggg gca atg	960
	Ile Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met	
	305 310 315 320	
65	gcg cgc ctg ctg gaa gat ggc gat ggc gcc tca cca ggt caa gac ata	1008
	Ala Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Gly Ala Ser Pro Gly Gln Asp Ile	
	325 330 335	
70	cag ttg att cca cca ctg atc aac ctg tta atg agc att gaa cca gat	1056
	Gln Leu Ile Pro Pro Leu Ile Asn Leu Leu Met Ser Ile Glu Pro Asp	
	340 345 350	

EP 1 170 364 A1

	gtg atc tat gca gga cat gac aac aca aaa cct gac acc tcc agt tct	1104
	Val Ile Tyr Ala Gly His Asp Asn Thr Lys Pro Asp Thr Ser Ser Ser	
	355 360 365	
5	ttg ctg aca agt ctt aat caa cta ggc gag agg caa ctt ctt tca gta	1152
	Leu Leu Thr Ser Leu Asn Gln Leu Gly Glu Arg Gln Leu Leu Ser Val	
	370 375 380	
10	gtc aag tgg tct aaa tca ttg cca ggt ttt cga aac tta cat att gat	1200
	Val Lys Trp Ser Lys Ser Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Ile Asp	
	385 390 395 400	
	gac cag ata act ctc att cag tat tct tgg atg agc tta atg gtg ttt	1248
	Asp Gln Ile Thr Leu Ile Gln Tyr Ser Trp Met Ser Leu Met Val Phe	
	405 410 415	
15	ggg cta gga tgg aga tcc tac aaa cac gtc agt ggg cag atg ctg tat	1296
	Gly Leu Gly Trp Arg Ser Tyr Lys His Val Ser Gly Gln Met Leu Tyr	
	420 425 430	
20	ttt gca cct gat cta ata cta aat gaa cag cgg atg aaa gaa tca tca	1344
	Phe Ala Pro Asp Leu Ile Leu Asn Glu Gln Arg Met Lys Glu Ser Ser	
	435 440 445	
	ttc tat tca tta tgc ctt acc atg tgg cag atc cca cag gag ttt gtc	1392
	Phe Tyr Ser Leu Cys Leu Thr Met Trp Gln Ile Pro Gln Glu Phe Val	
	450 455 460	
25	aag ctt caa gtt agc caa gaa gag ttc ctc tgt atg aaa gta ttg tta	1440
	Lys Leu Gln Val Ser Gln Glu Glu Phe Leu Cys Met Lys Val Leu Leu	
	465 470 475 480	
30	ctt ctt aat aca att cct ttg gaa ggg cta cga agt caa acc cag ttt	1488
	Leu Leu Asn Thr Ile Pro Leu Glu Gly Leu Arg Ser Gln Thr Gln Phe	
	485 490 495	
	gag gag atg agg tca agc tac att aga gag ctc atc aag gca att ggt	1536
	Glu Glu Met Arg Ser Tyr Ile Arg Glu Leu Ile Lys Ala Ile Gly	
	500 505 510	
35	ttg agg caa aaa gga gtt gtg tcg agc tca cag cgt ttc tat caa ctt	1584
	Leu Arg Gln Lys Gly Val Val Ser Ser Ser Gln Arg Phe Tyr Gln Leu	
	515 520 525	
40	aca aaa ctt ctt gat aac ttg cat gat ctt gtc aaa caa ctt cat ctg	1632
	Thr Lys Leu Leu Asp Asn Leu His Asp Leu Val Lys Gln Leu His Leu	
	530 535 540	
45	tac tgc ttg aat aca ttt atc cag tcc cgg gca ctg agt gtt gaa ttt	1680
	Tyr Cys Leu Asn Thr Phe Ile Gln Ser Arg Ala Leu Ser Val Glu Phe	
	545 550 555 560	
	cca gaa atg atg tct gaa gtt att gct atg cat gcg tac gga tag	1725
	Pro Glu Met Met Ser Glu Val Ile Ala Met His Ala Tyr Gly	
	565 570	
50		
	<210> 6	
	<211> 574	
	<212> PRT	
55	<213> Künstliche Sequenz	

EP 1 170 364 A1

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusionsprotein Bacteriophage
P1-Cre19V336A-PR676-914

5 <400> 6
Met Gly Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe
1 5 10 15
Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser
20 25 30
10 Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp
35 40 45
Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln
50 55 60
15 Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu
65 70 75 80
Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn
85 90 95
20 Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala
100 105 110
Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp
115 120 125
25 Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg
130 135 140
Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala
145 150 155 160
30 Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly
165 170 175
Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala
180 185 190
35 Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg
195 200 205
40 Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe
210 215 220
Cys Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln
225 230 235 240
45 Leu Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu
245 250 255
Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser
260 265 270
50 Gly His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly
275 280 285
Val Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn
290 295 300
55

EP 1 170 364 A1

Ile Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met
 305 310 315 320
 5 Ala Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Gly Ala Ser Pro Gly Gln Asp Ile
 325 330 335
 Gln Leu Ile Pro Pro Leu Ile Asn Leu Leu Met Ser Ile Glu Pro Asp
 340 345 350
 10 Val Ile Tyr Ala Gly His Asp Asn Thr Lys Pro Asp Thr Ser Ser Ser
 355 360 365
 Leu Leu Thr Ser Leu Asn Gln Leu Gly Glu Arg Gln Leu Leu Ser Val
 370 375 380
 15 Val Lys Trp Ser Lys Ser Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Ile Asp
 385 390 395 400
 Asp Gln Ile Thr Leu Ile Gln Tyr Ser Trp Met Ser Leu Met Val Phe
 405 410 415
 20 Gly Leu Gly Trp Arg Ser Tyr Lys His Val Ser Gly Gln Met Leu Tyr
 420 425 430
 Phe Ala Pro Asp Leu Ile Leu Asn Glu Gln Arg Met Lys Glu Ser Ser
 435 440 445
 25 Phe Tyr Ser Leu Cys Leu Thr Met Trp Gln Ile Pro Gln Glu Phe Val
 450 455 460
 Lys Leu Gln Val Ser Gln Glu Glu Phe Leu Cys Met Lys Val Leu Leu
 465 470 475 480
 30 Leu Leu Asn Thr Ile Pro Leu Glu Gly Leu Arg Ser Gln Thr Gln Phe
 485 490 495
 Glu Glu Met Arg Ser Ser Tyr Ile Arg Glu Leu Ile Lys Ala Ile Gly
 500 505 510
 35 Leu Arg Gln Lys Gly Val Val Ser Ser Ser Gln Arg Phe Tyr Gln Leu
 515 520 525
 Thr Lys Leu Leu Asp Asn Leu His Asp Leu Val Lys Gln Leu His Leu
 530 535 540
 40 Tyr Cys Leu Asn Thr Phe Ile Gln Ser Arg Ala Leu Ser Val Glu Phe
 545 550 555 560
 45 Pro Glu Met Met Ser Glu Val Ile Ala Met His Ala Tyr Gly
 565 570

<210> 7

<211> 1725

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusionsprotein hCrel9V336A-PR676-914

EP 1 170 364 A1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1722)

5	<400> 7	
	atg ggt gcc acc tct gat gaa gtc agg aag aac ctg atg gac atg ttc	48
	Met Gly Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe	
	1 5 10 15	
10	agg gac agg cag gcc ttc tct gaa cac acc tgg aag atg ctc ctg tct	96
	Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Ser	
	20 25 30	
15	gtg tgc aga tcc tgg gct gcc tgg tgc aag ctg aac aac agg aaa tgg	144
	Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp	
	35 40 45	
	ttc cct gct gaa cct gag gat gtg agg gac tac ctc ctg tac ctg caa	192
	Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln	
	50 55 60	
20	gcc aga ggc ctg gct gtg aag acc atc caa cag cac ctg ggc cag ctc	240
	Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln His Leu Gly Gln Leu	
	65 70 75 80	
25	aac atg ctg cac agg aga tct ggc ctg cct cgc cct tct gac tcc aat	288
	Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn	
	85 90 95	
30	gct gtg tcc ctg gtg atg agg aga atc aga aag gag aat gtg gat gct	336
	Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala	
	100 105 110	
	ggg gag aga gcc aag cag gcc ctg gcc ttt gaa cgc act gac ttt gac	384
	Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp	
	115 120 125	
35	caa gtc aga tcc ctg atg gag aac tct gac aga tgc cag gac atc agg	432
	Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg	
	130 135 140	
40	aac ctg gcc ttc ctg ggc att gcc tac aac acc ctg ctg cgc att gcc	480
	Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala	
	145 150 155 160	
	gaa att gcc aga atc aga gtg aag gac atc tcc cgc acc gat ggt ggg	528
	Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly	
	165 170 175	
45	aga atg ctg atc cac att ggc agg acc aag acc ctg gtg tcc aca gct	576
	Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala	
	180 185 190	
50	ggt gtg gag aag gcc ctg tcc ctg ggg gtt acc aag ctg gtg gag aga	624
	Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg	
	195 200 205	
55	tgg atc tct gtg tct ggt gtg gct gat gac ccc aac aac tac ctg ttc	672
	Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe	
	210 215 220	

EP 1 170 364 A1

	tgc	cgg	gtc	aga	aag	aat	ggt	gtg	gct	gcc	cct	tct	gcc	acc	tcc	caa	720
	Cys	Arg	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln	
	225					230					235					240	
5	ctg	tcc	acc	cgg	gcc	ctg	gaa	ggg	atc	ttt	gag	gcc	acc	cac	cgc	ctg	768
	Leu	Ser	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Phe	Glu	Ala	Thr	His	Arg	Leu	
					245					250					255		
10	atc	tat	ggt	gcc	aag	gat	gac	tct	ggg	cag	aga	tac	ctg	gcc	tgg	tct	816
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Ser	
				260					265					270			
15	ggc	cac	tct	gcc	aga	gtg	ggt	gct	gcc	agg	gac	atg	gcc	agg	gct	ggg	864
	Gly	His	Ser	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala	Arg	Ala	Gly	
			275					280					285				
20	gtg	tcc	atc	cct	gaa	atc	atg	cag	gct	ggt	ggc	tgg	acc	aat	gtg	aac	912
	Val	Ser	Ile	Pro	Glu	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Asn	Val	Asn	
	290						295					300					
25	att	gtg	atg	aac	tac	atc	aga	aac	ctg	gac	tct	gag	act	ggg	gcc	atg	960
	Ile	Val	Met	Asn	Tyr	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Ala	Met	
	305					310					315					320	
30	gcg	agg	ctg	ctc	gag	gat	ggg	gac	ggc	gcc	tca	cca	ggt	caa	gac	ata	1008
	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gln	Asp	Ile	
					325				330					335			
35	cag	ttg	att	cca	cca	ctg	atc	aac	ctg	tta	atg	agc	att	gaa	cca	gat	1056
	Gln	Leu	Ile	Pro	Pro	Leu	Ile	Asn	Leu	Leu	Met	Ser	Ile	Glu	Pro	Asp	
				340					345					350			
40	gtg	atc	tat	gca	gga	cat	gac	aac	aca	aaa	cct	gac	acc	tcc	agt	tct	1104
	Val	Ile	Tyr	Ala	Gly	His	Asp	Asn	Thr	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	
			355				360						365				
45	ttg	ctg	aca	agt	ctt	aat	caa	cta	ggc	gag	agg	caa	ctt	ctt	tca	gta	1152
	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Gln	Leu	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Val	
	370						375					380					
50	gtc	aag	tgg	tct	aaa	tca	ttg	cca	ggt	ttt	cga	aac	tta	cat	att	gat	1200
	Val	Lys	Trp	Ser	Lys	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Asp	
	385					390					395					400	
55	gac	cag	ata	act	ctc	att	cag	tat	tct	tgg	atg	agc	tta	atg	gtg	ttt	1248
	Asp	Gln	Ile	Thr	Leu	Ile	Gln	Tyr	Ser	Trp	Met	Ser	Leu	Met	Val	Phe	
					405					410					415		
60	ggt	cta	gga	tgg	aga	tcc	tac	aaa	cac	gtc	agt	ggg	cag	atg	ctg	tat	1296
	Gly	Leu	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr	Lys	His	Val	Ser	Gly	Gln	Met	Leu	Tyr	
				420					425					430			
65	ttt	gca	cct	gat	cta	ata	cta	aat	gaa	cag	cgg	atg	aaa	gaa	tca	tca	1344
	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Asn	Glu	Gln	Arg	Met	Lys	Glu	Ser	Ser	
			435					440					445				
70	ttc	tat	tca	tta	tgc	ctt	acc	atg	tgg	cag	atc	cca	cag	gag	ttt	gtc	1392
	Phe	Tyr	Ser	Leu	Cys	Leu	Thr	Met	Trp	Gln	Ile	Pro	Gln	Glu	Phe	Val	
	450						455					460					

EP 1 170 364 A1

	aag ctt caa gtt agc caa gaa gag ttc ctc tgt atg aaa gta ttg tta	1440
	Lys Leu Gln Val Ser Gln Glu Glu Phe Leu Cys Met Lys Val Leu Leu	
	465 470 475 480	
5	ctt ctt aat aca att cct ttg gaa ggg cta cga agt caa acc cag ttt	1488
	Leu Leu Asn Thr Ile Pro Leu Glu Gly Leu Arg Ser Gln Thr Gln Phe	
	485 490 495	
10	gag gag atg agg tca agc tac att aga gag ctc atc aag gca att ggt	1536
	Glu Glu Met Arg Ser Tyr Ile Arg Glu Leu Ile Lys Ala Ile Gly	
	500 505 510	
	ttg agg caa aaa gga gtt gtg tgc agc tca cag cgt ttc tat caa ctt	1584
	Leu Arg Gln Lys Gly Val Val Ser Ser Ser Gln Arg Phe Tyr Gln Leu	
	515 520 525	
15	aca aaa ctt ctt gat aac ttg cat gat ctt gtc aaa caa ctt cat ctg	1632
	Thr Lys Leu Leu Asp Asn Leu His Asp Leu Val Lys Gln Leu His Leu	
	530 535 540	
20	tac tgc ttg aat aca ttt atc cag tcc cgg gca ctg agt gtt gaa ttt	1680
	Tyr Cys Leu Asn Thr Phe Ile Gln Ser Arg Ala Leu Ser Val Glu Phe	
	545 550 555 560	
	cca gaa atg atg tct gaa gtt att gct atg cat gcg tac gga tag	1725
	Pro Glu Met Met Ser Glu Val Ile Ala Met His Ala Tyr Gly	
	565 570	
25		
	<210> 8	
	<211> 574	
	<212> PRT	
	<213> Künstliche Sequenz	
30	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:	
	Fusionsprotein hCrel9V336A-PR676-914	
	<400> 8	
35	Met Gly Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe	
	1 5 10 15	
	Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser	
	20 25 30	
40	Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp	
	35 40 45	
	Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln	
	50 55 60	
45	Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu	
	65 70 75 80	
	Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn	
	85 90 95	
50	Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala	
	100 105 110	
	Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp	
	115 120 125	
55		

EP 1 170 364 A1

	Gln	Val	Arg	Ser	Leu	Met	Glu	Asn	Ser	Asp	Arg	Cys	Gln	Asp	Ile	Arg
	130						135					140				
5	Asn	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Ala	Tyr	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Ala
	145					150					155					160
	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Arg	Val	Lys	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Gly
					165					170					175	
10	Arg	Met	Leu	Ile	His	Ile	Gly	Arg	Thr	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Thr	Ala
				180					185					190		
	Gly	Val	Glu	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Glu	Arg
			195					200					205			
15	Trp	Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Ala	Asp	Asp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Leu	Phe
	210						215					220				
	Cys	Arg	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln
	225					230					235					240
20	Leu	Ser	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Phe	Glu	Ala	Thr	His	Arg	Leu
					245					250					255	
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Ser
				260					265					270		
25	Gly	His	Ser	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala	Arg	Ala	Gly
			275					280					285			
	Val	Ser	Ile	Pro	Glu	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Asn	Val	Asn
							295					300				
30	Ile	Val	Met	Asn	Tyr	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Ala	Met
	305					310					315					320
	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gln	Asp	Ile
35					325					330					335	
	Gln	Leu	Ile	Pro	Pro	Leu	Ile	Asn	Leu	Leu	Met	Ser	Ile	Glu	Pro	Asp
				340				345						350		
40	Val	Ile	Tyr	Ala	Gly	His	Asp	Asn	Thr	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser
			355					360					365			
	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Gln	Leu	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Val
		370				375						380				
45	Val	Lys	Trp	Ser	Lys	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Asp
	385					390					395					400
	Asp	Gln	Ile	Thr	Leu	Ile	Gln	Tyr	Ser	Trp	Met	Ser	Leu	Met	Val	Phe
					405					410					415	
50	Gly	Leu	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr	Lys	His	Val	Ser	Gly	Gln	Met	Leu	Tyr
				420					425					430		
	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Asn	Glu	Gln	Arg	Met	Lys	Glu	Ser	Ser
			435					440					445			
55																

EP 1 170 364 A1

	Phe	Tyr	Ser	Leu	Cys	Leu	Thr	Met	Trp	Gln	Ile	Pro	Gln	Glu	Phe	Val	
	450						455					460					
5	Lys	Leu	Gln	Val	Ser	Gln	Glu	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Lys	Val	Leu	Leu	
	465					470					475				480		
	Leu	Leu	Asn	Thr	Ile	Pro	Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Gln	Phe	
					485					490					495		
10	Glu	Glu	Met	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ile	Arg	Glu	Leu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	
				500					505					510			
	Leu	Arg	Gln	Lys	Gly	Val	Val	Ser	Ser	Ser	Gln	Arg	Phe	Tyr	Gln	Leu	
			515					520					525				
15	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Asp	Leu	Val	Lys	Gln	Leu	His	Leu	
	530					535						540					
	Tyr	Cys	Leu	Asn	Thr	Phe	Ile	Gln	Ser	Arg	Ala	Leu	Ser	Val	Glu	Phe	
	545					550					555					560	
20	Pro	Glu	Met	Met	Ser	Glu	Val	Ile	Ala	Met	His	Ala	Tyr	Gly			
					565					570							
	<210> 9																
25	<211> 1800																
	<212> DNA																
	<213> Künstliche Sequenz																
	<220>																
30	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:																
	Fusionsprotein hCre19V336A-PR650-914																
	<220>																
	<221> CDS																
	<222> (1)..(1797)																
35	<400> 9																
	atg	ggt	gcc	acc	tct	gat	gaa	gtc	agg	aag	aac	ctg	atg	gac	atg	ttc	48
	Met	Gly	Ala	Thr	Ser	Asp	Glu	Val	Arg	Lys	Asn	Leu	Met	Asp	Met	Phe	
	1				5					10				15			
40	agg	gac	agg	cag	gcc	ttc	tct	gaa	cac	acc	tgg	aag	atg	ctc	ctg	tct	96
	Arg	Asp	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	His	Thr	Trp	Lys	Met	Leu	Leu	Ser	
				20					25					30			
45	gtg	tgc	aga	tcc	tgg	gct	gcc	tgg	tgc	aag	ctg	aac	aac	agg	aaa	tgg	144
	Val	Cys	Arg	Ser	Trp	Ala	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu	Asn	Asn	Arg	Lys	Trp	
				35				40					45				
	ttc	cct	gct	gaa	cct	gag	gat	gtg	agg	gac	tac	ctc	ctg	tac	ctg	caa	192
	Phe	Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Arg	Asp	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Leu	Gln	
		50				55					60						
50	gcc	aga	ggc	ctg	gct	gtg	aag	acc	atc	caa	cag	cac	ctg	ggc	cag	ctc	240
	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Thr	Ile	Gln	Gln	His	Leu	Gly	Gln	Leu	
	65					70					75					80	
55																	

EP 1 170 364 A1

	aac	atg	ctg	cac	agg	aga	tct	ggc	ctg	cct	cgc	cct	tct	gac	tcc	aat	288
	Asn	Met	Leu	His	Arg	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Ser	Asp	Ser	Asn	
					85					90					95		
5	gct	gtg	tcc	ctg	gtg	atg	agg	aga	atc	aga	aag	gag	aat	gtg	gat	gct	336
	Ala	Val	Ser	Leu	Val	Met	Arg	Arg	Ile	Arg	Lys	Glu	Asn	Val	Asp	Ala	
				100					105					110			
10	ggg	gag	aga	gcc	aag	cag	gcc	ctg	gcc	ttt	gaa	cgc	act	gac	ttt	gac	384
	Gly	Glu	Arg	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	Ala	Phe	Glu	Arg	Thr	Asp	Phe	Asp	
			115					120					125				
15	caa	gtc	aga	tcc	ctg	atg	gag	aac	tct	gac	aga	tgc	cag	gac	atc	agg	432
	Gln	Val	Arg	Ser	Leu	Met	Glu	Asn	Ser	Asp	Arg	Cys	Gln	Asp	Ile	Arg	
		130					135					140					
20	aac	ctg	gcc	ttc	ctg	ggc	att	gcc	tac	aac	acc	ctg	ctg	cgc	att	gcc	480
	Asn	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Ala	Tyr	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Ala	
	145				150					155					160		
25	gaa	att	gcc	aga	atc	aga	gtg	aag	gac	atc	tcc	cgc	acc	gat	ggg	ggg	528
	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Arg	Val	Lys	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Gly	
				165					170						175		
30	aga	atg	ctg	atc	cac	att	ggc	agg	acc	aag	acc	ctg	gtg	tcc	aca	gct	576
	Arg	Met	Leu	Ile	His	Ile	Gly	Arg	Thr	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Thr	Ala	
			180					185						190			
35	ggg	gtg	gag	aag	gcc	ctg	tcc	ctg	ggg	ggt	acc	aag	ctg	gtg	gag	aga	624
	Gly	Val	Glu	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Glu	Arg	
			195					200					205				
40	tgg	atc	tct	gtg	tct	ggg	gtg	gct	gat	gac	ccc	aac	aac	tac	ctg	ttc	672
	Trp	Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Ala	Asp	Asp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Leu	Phe	
		210				215						220					
45	tgc	cgg	gtc	aga	aag	aat	ggg	gtg	gct	gcc	cct	tct	gcc	acc	tcc	caa	720
	Cys	Arg	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln	
	225				230						235					240	
50	ctg	tcc	acc	cgg	gcc	ctg	gaa	ggg	atc	ttt	gag	gcc	acc	cac	cgc	ctg	768
	Leu	Ser	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Phe	Glu	Ala	Thr	His	Arg	Leu	
				245					250						255		
55	atc	tat	ggg	gcc	aag	gat	gac	tct	ggg	cag	aga	tac	ctg	gcc	tgg	tct	816
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Ser	
			260					265						270			
60	ggc	cac	tct	gcc	aga	gtg	ggg	gct	gcc	agg	gac	atg	gcc	agg	gct	ggg	864
	Gly	His	Ser	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala	Arg	Ala	Gly	
			275				280						285				
65	gtg	tcc	atc	cct	gaa	atc	atg	cag	gct	ggg	ggc	tgg	acc	aat	gtg	aac	912
	Val	Ser	Ile	Pro	Glu	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Asn	Val	Asn	
		290					295					300					
70	att	gtg	atg	aac	tac	atc	aga	aac	ctg	gac	tct	gag	act	ggg	gcc	atg	960
	Ile	Val	Met	Asn	Tyr	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Ala	Met	
	305				310						315					320	

EP 1 170 364 A1

	gcg	agg	ctg	ctc	gag	gat	ggg	gac	ggc	gcc	ctg	gat	gct	gtt	gct	ctc	1008
	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	Gly	Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Ala	Leu	
					325					330					335		
5	cca	cag	cca	gtg	ggc	gtt	cca	aat	gaa	agc	caa	gcc	cta	agc	cag	aga	1056
	Pro	Gln	Pro	Val	Gly	Val	Pro	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Gln	Arg	
				340					345					350			
10	ttc	act	ttt	tca	cca	ggg	caa	gac	ata	cag	ttg	att	cca	cca	ctg	atc	1104
	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Gly	Gln	Asp	Ile	Gln	Leu	Ile	Pro	Pro	Leu	Ile	
			355					360					365				
15	aac	ctg	tta	atg	agc	att	gaa	cca	gat	gtg	atc	tat	gca	gga	cat	gac	1152
	Asn	Leu	Leu	Met	Ser	Ile	Glu	Pro	Asp	Val	Ile	Tyr	Ala	Gly	His	Asp	
		370					375					380					
20	aac	aca	aaa	cct	gac	acc	tcc	agt	tct	ttg	ctg	aca	agt	ctt	aat	caa	1200
	Asn	Thr	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Gln	
	385					390					395					400	
25	cta	ggc	gag	agg	caa	ctt	ctt	tca	gta	gtc	aag	tgg	tct	aaa	tca	ttg	1248
	Leu	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Val	Val	Lys	Trp	Ser	Lys	Ser	Leu	
					405					410					415		
30	cca	ggg	ttt	cga	aac	tta	cat	att	gat	gac	cag	ata	act	ctc	att	cag	1296
	Pro	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Asp	Asp	Gln	Ile	Thr	Leu	Ile	Gln	
				420					425					430			
35	tat	tct	tgg	atg	agc	tta	atg	gtg	ttt	ggg	cta	gga	tgg	aga	tcc	tac	1344
	Tyr	Ser	Trp	Met	Ser	Leu	Met	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr	
			435					440					445				
40	aaa	cac	gtc	agt	ggg	cag	atg	ctg	tat	ttt	gca	cct	gat	cta	ata	cta	1392
	Lys	His	Val	Ser	Gly	Gln	Met	Leu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	
		450				455					460						
45	aat	gaa	cag	cgg	atg	aaa	gaa	tca	tca	ttc	tat	tca	tta	tgc	ctt	acc	1440
	Asn	Glu	Gln	Arg	Met	Lys	Glu	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ser	Leu	Cys	Leu	Thr	
	465					470					475					480	
50	atg	tgg	cag	atc	cca	cag	gag	ttt	gtc	aag	ctt	caa	gtt	agc	caa	gaa	1488
	Met	Trp	Gln	Ile	Pro	Gln	Glu	Phe	Val	Lys	Leu	Gln	Val	Ser	Gln	Glu	
					485				490						495		
55	gag	ttc	ctc	tgt	atg	aaa	gta	ttg	tta	ctt	ctt	aat	aca	att	cct	ttg	1536
	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Asn	Thr	Ile	Pro	Leu	
				500				505						510			
60	gaa	ggg	cta	cga	agt	caa	acc	cag	ttt	gag	gag	atg	agg	tca	agc	tac	1584
	Glu	Gly	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Gln	Phe	Glu	Glu	Met	Arg	Ser	Ser	Tyr	
			515					520					525				
65	att	aga	gag	ctc	atc	aag	gca	att	ggg	ttg	agg	caa	aaa	gga	gtt	gtg	1632
	Ile	Arg	Glu	Leu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Leu	Arg	Gln	Lys	Gly	Val	Val	
		530					535					540					
70	tcg	agc	tca	cag	cgt	ttc	tat	caa	ctt	aca	aaa	ctt	ctt	gat	aac	ttg	1680
	Ser	Ser	Ser	Gln	Arg	Phe	Tyr	Gln	Leu	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	
	545					550					555					560	

EP 1 170 364 A1

cat gat ctt gtc aaa caa ctt cat ctg tac tgc ttg aat aca ttt atc 1728
His Asp Leu Val Lys Gln Leu His Leu Tyr Cys Leu Asn Thr Phe Ile
565 570 575

5 cag tcc cgg gca ctg agt gtt gaa ttt cca gaa atg atg tct gaa gtt 1776
Gln Ser Arg Ala Leu Ser Val Glu Phe Pro Glu Met Met Ser Glu Val
580 585 590

10 att gct atg cat gcg tac gga tag 1800
Ile Ala Met His Ala Tyr Gly
595

<210> 10
<211> 599
15 <212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusionsprotein hCre19V336A-PR650-914

20 <400> 10
Met Gly Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe
1 5 10 15

Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser
20 25 30

25 Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp
35 40 45

Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln
50 55 60

30 Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu
65 70 75 80

Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn
85 90 95

35 Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala
100 105 110

Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp
115 120 125

40 Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg
130 135 140

Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala
145 150 155 160

Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly
165 170 175

50 Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala
180 185 190

Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg
195 200 205

55

EP 1 170 364 A1

	Trp	Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Ala	Asp	Asp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Leu	Phe
	210						215					220				
5	Cys	Arg	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln
	225					230					235					240
	Leu	Ser	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Phe	Glu	Ala	Thr	His	Arg	Leu
					245					250					255	
10	Ile	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ala	Trp	Ser
				260					265					270		
	Gly	His	Ser	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala	Arg	Ala	Gly
			275					280					285			
15	Val	Ser	Ile	Pro	Glu	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Asn	Val	Asn
	290						295					300				
	Ile	Val	Met	Asn	Tyr	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Ala	Met
	305					310					315					320
20	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	Gly	Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Ala	Leu
					325					330					335	
	Pro	Gln	Pro	Val	Gly	Val	Pro	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Gln	Arg
				340					345					350		
25	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Gly	Gln	Asp	Ile	Gln	Leu	Ile	Pro	Pro	Leu	Ile
			355					360					365			
	Asn	Leu	Leu	Met	Ser	Ile	Glu	Pro	Asp	Val	Ile	Tyr	Ala	Gly	His	Asp
	370						375					380				
30	Asn	Thr	Lys	Pro	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Gln
	385					390					395					400
	Leu	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Val	Val	Lys	Trp	Ser	Lys	Ser	Leu
35					405					410					415	
	Pro	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Asp	Asp	Gln	Ile	Thr	Leu	Ile	Gln
				420					425					430		
40	Tyr	Ser	Trp	Met	Ser	Leu	Met	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr
			435					440					445			
	Lys	His	Val	Ser	Gly	Gln	Met	Leu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu
	450						455					460				
45	Asn	Glu	Gln	Arg	Met	Lys	Glu	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ser	Leu	Cys	Leu	Thr
	465					470					475					480
	Met	Trp	Gln	Ile	Pro	Gln	Glu	Phe	Val	Lys	Leu	Gln	Val	Ser	Gln	Glu
					485					490					495	
50	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Asn	Thr	Ile	Pro	Leu
				500					505					510		
	Glu	Gly	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Gln	Phe	Glu	Glu	Met	Arg	Ser	Ser	Tyr
			515					520					525			
55																

EP 1 170 364 A1

Ile Arg Glu Leu Ile Lys Ala Ile Gly Leu Arg Gln Lys Gly Val Val
530 535 540

5 Ser Ser Ser Gln Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Asn Leu
545 550 555 560

His Asp Leu Val Lys Gln Leu His Leu Tyr Cys Leu Asn Thr Phe Ile
565 570 575

10 Gln Ser Arg Ala Leu Ser Val Glu Phe Pro Glu Met Met Ser Glu Val
580 585 590

Ile Ala Met His Ala Tyr Gly
595

15 <210> 11
<211> 81
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 3'-Ende der
Cre-kodierenden Sequenz von Bacteriophagen P1-Cre

25 <400> 11
aatgtaaata ttgtcatgaa ctatatccgt aacctggata gtgaaacagg ggcaatgggtg 60
cgctgtctgg aagatggcga t 81

30 <210> 12
<211> 81
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 3'-Ende der
Cre-kodierenden Sequenz von hCre

40 <400> 12
aatgtgaaca ttgtgatgaa ctacatcaga aacctggact ctgagactgg ggccatgggtg 60
aggctgctcg aggatgggga c 81

45 <210> 13
<211> 81
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

50 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 3'-Ende der
Cre-kodierenden Sequenz von P1-CreV336A

55 <400> 13
aatgtaaata ttgtcatgaa ctatatccgt aacctggata gtgaaacagg ggcaatggcg 60
cgctgtctgg aagatggcga t 81

<210> 14
<211> 81
<212> DNA

EP 1 170 364 A1

<213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 3'-Ende der
 5 Cre-kodierenden Sequenz von hCreV336A

 <400> 14
 aatgtgaaca ttgtgatgaa ctacatcaga aacctggact ctgagactgg ggccatggcg 60
 aggctgctcg aggatgggga c 81
 10

 <210> 15
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 15

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 15
 20 aaattcgtag gcatcgccat ttccagcag g 31

 <210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 25 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 16
 30 aaattggcgc catcgccatc ttccagcagg 30

 <210> 17
 <211> 29
 <212> DNA
 35 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 17
 40 aatttggcgc cgtcccatc ctgagcag 29

 <210> 18
 <211> 44
 <212> DNA
 45 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 18
 50 aaattggcgc catcgccatc ttccagcagg cgcgccattg cccc 44

 <210> 19
 55 <211> 44

<212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 19
 aaattggcgc cgtcccccac ctcgagcagc ctcgccatgg cccc 44
 10 <210> 20
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 15 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 20
 gggggatcca ccatgggtgc ctccaacctg ctgactgtg 39
 20 <210> 21
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 25 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 21
 30 ttttaaggatc caccatgggt gccacgagtg atgaggttcg ca 42
 <210> 22
 <211> 32
 <212> DNA
 35 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 22
 40 ttttaacgtac ggcacgagtg atgaggttcg ca 32
 <210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 45 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 23
 50 ttttaaggcgc cacgagtgat gaggttcgca 30
 55

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die für eine Mutante der Bakteriophagen-P1-Rekombinase Cre kodiert, in der die kryptische Spleißstelle in der Sequenz ATG GTG CGC, die der Position 1003 - 1011 in der in SEQ ID NO:1 gezeigten Wildtypsequenz entspricht, durch eine die Cre-Proteinsequenz ändernde Basenmutation ausgeschaltet ist.
2. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, wobei das Kodon GTG in der genannten Spleißstellensequenz, durch ein Kodon XYZ ersetzt ist, wobei X, Y und Z unabhängig voneinander die Nucleotide A, T, C oder G sind, mit der Maßgabe, daß wenn X = G, dann Y ≠ T.
3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 2, wobei das Kodon XYZ für eine neutrale Aminosäure kodiert und insbesondere das Ala kodierende Kodon GCG ist.
4. DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, in der andere in der Wildtypsequenz vorhandene kryptische Spleißstellen durch stille Mutation und/oder durch eine die Cre-Proteinsequenz ändernde Basenmutationen ausgeschaltet sind.
5. DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, die am 5'-Terminus, bezogen auf die Cre-Wildtypsequenz, trunziert ist, insbesondere eine DNA-Sequenz, in der die Nukleotide, die der Position 1 bis 54 des Wildtyps entsprechen.
6. DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die DNA-Sequenz am 5'-Ende für zusätzliche, in der Wildtyp-Cre-Sequenz nicht vorhandene Aminosäuren kodierende Nukleotide aufweist.
7. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6, wobei die zusätzlichen Nukleotide für neutrale Aminosäuren, insbesondere für Met, Gly, Val und Ala, kodieren.
8. DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei die DNA-Sequenz am 3'-Terminus, bezogen auf die Wildtypsequenz, trunziert ist.
9. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz die Nukleotide 1 bis 984 der SEQ ID NOs: 5, 7 oder 9 umfaßt.
10. DNA-Sequenz, die für ein Fusionsprotein aus der Bakteriophagen-P1-Rekombinase Cre und einem weiteren funktionellen Protein kodiert, wobei die die Bakteriophagen-P1-Rekombinase Cre kodierende Sequenz wie in Ansprüchen 1 bis 9 definiert ist.
11. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 10, wobei das funktionelle Protein eine ligandenbindende Domäne eines Rezeptorproteins ist, insbesondere der Rezeptor ein Stereoid-Rezeptor, bevorzugt ein Progesteron-, Östrogen- oder Glucocorticoid-Rezeptor ist.
12. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 11, wobei der Rezeptor ein Progesteronrezeptor ist, insbesondere ein Progesteronrezeptor, der die Nukleotide 1948 bis 2742 der SEQ ID NO: 3 umfaßt.
13. DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei in der für die ligandenbindende Domäne kodierende Sequenz kryptische Spleißstellen durch stille Mutation oder durch eine die Proteinsequenz der ligandenbindenden Domäne ändernde Basenmutation ausgeschaltet sind.
14. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 10, die die in SEQ ID NOs:5, 7 oder 9 gezeigte Sequenz aufweist.
15. Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14.
16. Mikroorganismus oder transgenes Lebewesen, enthaltend einen Vektor, wie in Anspruch 15 definiert und/oder eine DNA-Sequenz wie in Ansprüchen 1 bis 14 definiert.
17. Cre-Mutante oder Cre-Fusionsprotein, das von der DNA-Sequenz gemäß Ansprüchen 1 bis 14 kodiert wird.
18. Verfahren zur Herstellung einer Cre-Mutante oder eines Cre-Fusionsproteins, wie in Anspruch 17 definiert, um-

EP 1 170 364 A1

fassend das Kultivieren eines Mikroorganismusses oder einer Zellkultur, der/die mit einem Vektor gemäß Anspruch 15 transformiert oder transfiziert ist.

- 5 **19.** Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Ansprüchen 11 bis 14 zur Mutagenese und/oder Rekombination von loxP-Stellen enthaltende Zielsequenzen in Lebewesen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 2

A

```

AGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAAT-----
.....
AGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAATAATTGTCATGAACATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGC
SD(5,8)

CTGCTGGAAGATGGCGATGGCGCCCTGGATGCTGTTGCTCTCCACAGCCAGTGGGCGTTCCAAATGAAAGCCAAGCCCTAAGCCAGAC

-----GTCAAGACATACAGTTGATTCCACCACTGA
.....
ATTCACTTTTCACCAGGTCGAAGACATACAGTTGATTCCACCACTGA
SA(11,2)
  
```

B

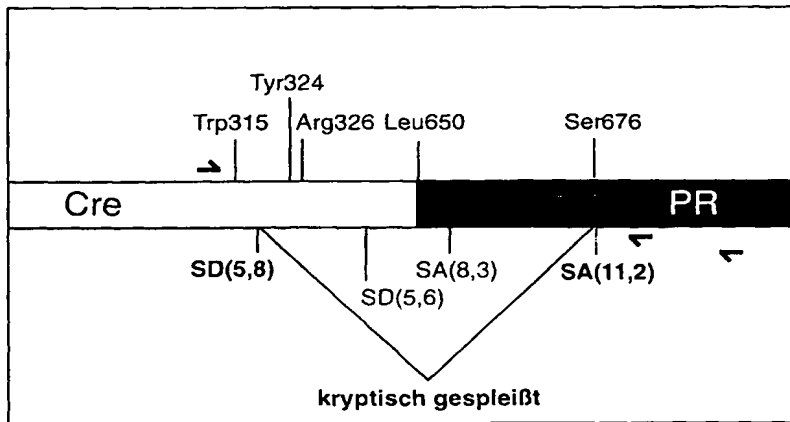


Fig. 3

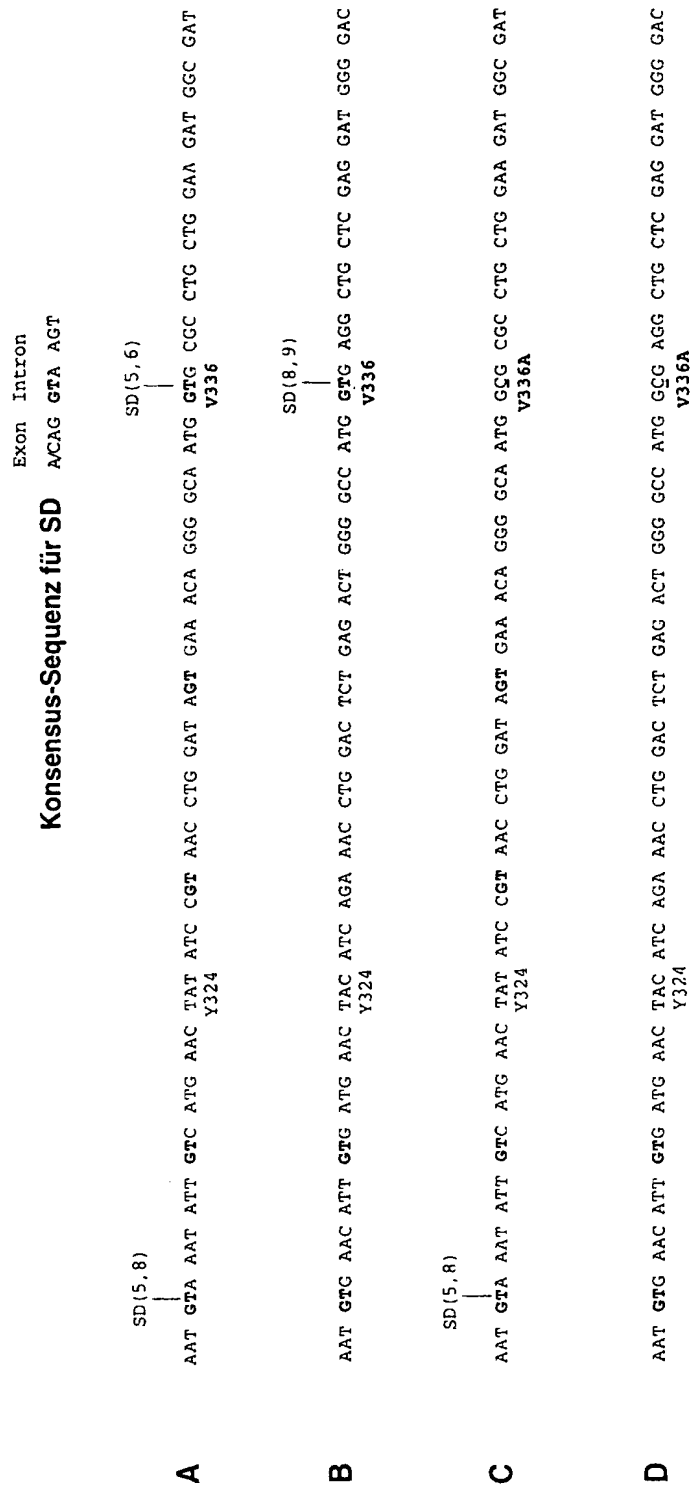


Fig. 4

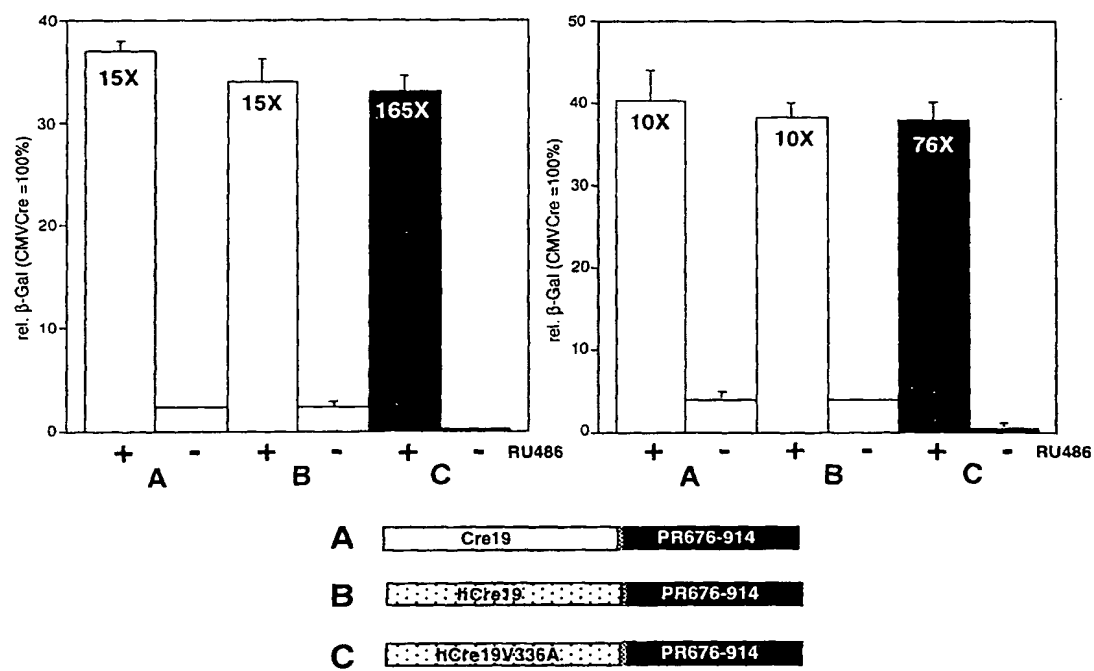


Fig. 5

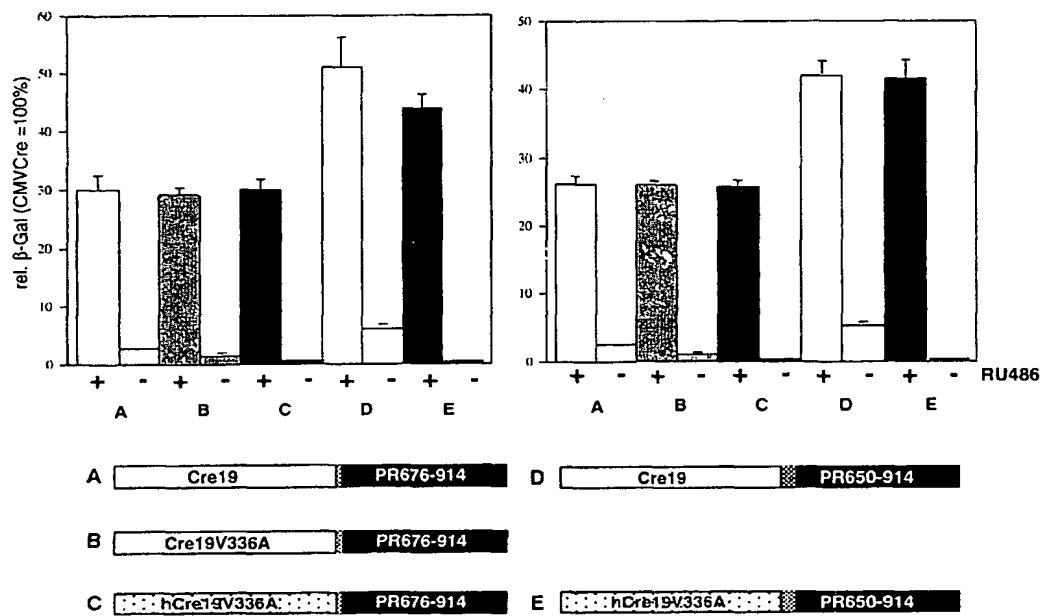
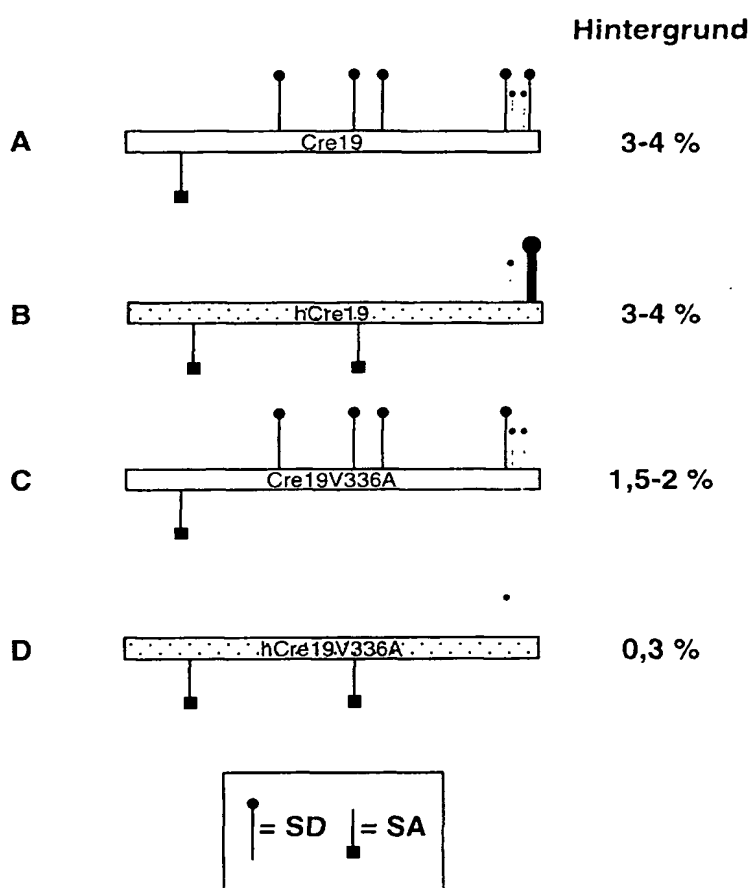


Fig. 6





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 4622

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	<p>GORSKI JESSICA A ET AL: "Efficient bicistronic expression of cre in mammalian cells." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 27, Nr. 9, 1. Mai 1999 (1999-05-01), Seiten 2059-2061, XP002154798 ISSN: 0305-1048 * das ganze Dokument *</p>		<p>C12N15/12 C12N15/52 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/85 C12N9/00 C12N5/10 C07K14/72</p>
A	<p>KORESAWA YUKIE ET AL: "Synthesis of a new cre recombinase gene based on optimal codon usage for mammalian systems." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), Bd. 127, Nr. 3, März 2000 (2000-03), Seiten 367-372, XP002154788 ISSN: 0021-924X * das ganze Dokument *</p>		
A	<p>WO 97 31108 A (GRONEMEYER HINRICH ;NICOLAS JEAN CLAUDE (FR); ROUX SYLVIE (FR); ME) 28. August 1997 (1997-08-28) * das ganze Dokument *</p>		<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)</p>
D,A	<p>SCHWENK FRIEDER ET AL: "Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 6, 15. März 1998 (1998-03-15), Seiten 1427-1432, XP002154789 ISSN: 0305-1048 * das ganze Dokument *</p>		<p>C12N C07K</p>
-/--			
Der vorliegende Recherchebericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
<p>Recherchenort DEN HAAG</p>		<p>Abschlußdatum der Recherche 6. Dezember 2000</p>	<p>Prüfer Hornig, H</p>
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p>		<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	

EPO FORM 1503 03.02 (P0403)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 4622

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
D,A	KELLENDONK CHRISTOPH ET AL: "Inducible site-specific recombination in the brain." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 285, Nr. 1, 8. Januar 1999 (1999-01-08), Seiten 175-182, XP002154790 ISSN: 0022-2836 * das ganze Dokument *		
D,A	FEIL ROBERT ET AL: "Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 237, Nr. 3, 1997, Seiten 752-757, XP002144708 ISSN: 0006-291X * das ganze Dokument *		
D,A	KELLENDONK C ET AL: "REGULATION OF CRE RECOMBINASE ACTIVITY BY THE SYNTHETIC STEROID RU 486" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 8, 1. August 1996 (1996-08-01), Seiten 1404-1411, XP002071703 ISSN: 0305-1048 * das ganze Dokument *		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 6. Dezember 2000	Prüfer Hornig, H
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P01C03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 4622

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	BROCARD JACQUES ET AL: "A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, IRL PRESS LTD., OXFORD, GB, Bd. 26, Nr. 17, 1998, Seiten 4086-4090, XP002144710 ISSN: 0305-1048 * das ganze Dokument *		
A	INDRA ARUP KUMAR ET AL: "Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: Comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ERT and Cre-ERT2 recombinases" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, IRL PRESS LTD., OXFORD, GB, Bd. 27, Nr. 22, 15. November 1999 (1999-11-15), Seiten 4324-4327, XP002144711 ISSN: 0305-1048 * das ganze Dokument *		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
A	WO 93 04200 A (UNIV TEXAS) 4. März 1993 (1993-03-04) * Seite 15, Zeile 9 - Zeile 27; Abbildungen 1,2 *		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 6. Dezember 2000	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P04/C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 00 11 4622

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

06-12-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9731108 A	28-08-1997	FR 2745008 A	22-08-1997
		AU 707684 B	15-07-1999
		AU 2098997 A	10-09-1997
		CA 2247517 A	28-08-1997
		EP 0896620 A	17-02-1999
		JP 2000505298 T	09-05-2000
WO 9304200 A	04-03-1993	AU 2479292 A	16-03-1993

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.